

**Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Casein  
Kinase 2: Vergleichende Phosphoproteom- und Metabolom-  
Analysen.**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Elena Bergner

geb. am 06.06.1984 in Gomel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Sacha Baginsky
  2. Prof. Dr. Udo Johannigmeier
  3. Prof. Dr. Thomas Pfannschmidt
- Datum der Verteidigung: 16.01.2020

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>13</b>
1.1	Der Ursprung des Lebens.....	13
1.2	Die Lichtreaktion der Photosynthese .....	14
1.3	Die Dunkelreaktion der Photosynthese.....	16
1.4	Proteinphosphorylierung als eine Form der posttranslationalen Modifikation .. .....	18
1.5	Casein Kinase 2 (EC.2.7.11.1) .....	20
1.6	Proteinphosphorylierung und CK2.....	23
1.7	Identifikation der Kinasesubstrate.....	24
1.7.1	Computerbasierte Methode .....	24
1.7.2	KESTREL ( <i>Kinase Substrate Tracking and Elucidation</i> ) als Methode der Substratsuche.....	25
1.7.3	Screen des Abbaus der Peptidbibliothek .....	25
1.7.4	Chemisch-genetische Methoden .....	26
1.7.5	Reverse in-Gel Kinase assay (RIKA) als weitere Methode zur Identifikation der Substrate .....	28
1.7.6	Peptidchip.....	29
1.7.7	Die Identifikation der Kinasesubstrate mit Protein <i>arrays</i> .....	29
1.7.8	SILAC steht für „ <i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i> “ ..	29
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
3.1.1	Anzucht auf Erde .....	32
3.1.2	Anzucht auf Platte.....	32
3.1.3	Probenentnahme .....	33

3.2	Bakterien .....	33
3.2.1	Anzucht von Zellen von <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.2.2	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	33
3.3	Plasmide und Vektoren.....	34
3.3.1	Plasmid pMALc5x (Amp <sup>+</sup> ).....	34
3.3.2	Plasmid pDONR223 (Spec <sup>+</sup> ) .....	35
3.3.3	Plasmid pEarleyGate205 .....	36
3.4	Primer .....	36
3.5	Antikörper .....	38
3.6	Molekularbiologische Methoden .....	38
3.6.1	DNA Extraktion aus Blättern .....	38
3.6.2	PCR (Polymerasekettenreaktion) .....	39
3.6.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) .....	39
3.6.4	Quantitative <i>real-time</i> -PCR-Effizienzanalyse .....	41
3.6.5	Prinzip des <i>tandem affinity peptide-tags</i> (TAP- <i>tag</i> ).....	41
3.6.6	<i>Gateway</i> -Klonierung .....	41
3.6.7	Transformation.....	43
3.6.7.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i> . .....	43
3.6.7.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen .....	43
3.6.7.3	Transformation von <i>Agrobacterien tumefaciens</i> .....	44
3.6.7.4	Floral Dip .....	44
3.7	Proteinchemische Methoden .....	44
3.7.1	Standardmethoden .....	44
3.7.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	44
3.7.1.2	Chlorophyllbestimmung der Pflanzenproben .....	45
3.7.1.3	Chloroform/ Methanol-Fällung von Proteinen .....	45
3.7.1.4	Aceton-Ethanol-Fällung der Proteine.....	45

3.7.2	Chloroplastenisolation .....	45
3.7.3	Herstellung von Pflanzenlysat .....	46
3.7.4	Herstellung von Wurzellysat .....	46
3.7.5	Herstellung von Chloroplastenlysat .....	46
3.7.6	Isolierung von Stroma .....	46
3.7.7	Dephosphorylierung von Stroma .....	47
3.7.8	Anreicherung mittels Heparinsepharose .....	47
3.7.9	Anreicherung mittels IgG Sepharose .....	49
3.7.10	Amylosereinigung und Gelfiltration .....	50
3.7.11	Radioaktiver Kinaseaktivitätsassay.....	50
3.7.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	51
3.7.13	Western Blot .....	52
3.8	Massenspektrometrie/ Proteomics.....	53
3.8.1	Probenvorbereitung .....	53
3.8.2	Für die Massenspektrometrie verwendete Geräte .....	57
3.8.2.1	Linear Ion Trap Mass Spektrometer (LTQ XL der Firma Thermo) .....	57
3.8.2.2	Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer (LTQ Orbitrap Velos Pro) . .....	58
3.8.2.3	Massenspektrometer Synapt G2S .....	58
3.8.3	Datenanalyse.....	60
3.8.3.1	Programm „Proteome-Discoverer“ .....	60
3.8.3.2	Programm „MaxQuant 1.3.0.5“ .....	61
3.8.3.3	Programm „ProteinLynx Global Server“ (PLGS).....	62
3.8.3.4	Programm „MassLynx V4.1“ .....	63
3.9	Massenspektrometrie/ Metabolomics .....	64
3.9.1	Probenvorbereitung .....	64
3.9.2	Für die Metabolitstudie verwendetes Gerät .....	64

3.9.3	Datenanalyse.....	65
3.10	ChloroPhos 1.0 CHIP .....	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
4.1	Chrakterisierung der GK615F11-Linie .....	68
4.2	Genetische Charakterisierung der verwendeten Pflanzenlinien .....	68
4.3	Phänotypische Charakterisierung des Wachstums der mutanten <i>ck2</i> -Pflanzen .....	69
4.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung der <i>ck2</i> -Pflanzen.....	72
4.4.1	<i>real-time</i> PCR Effizienzanalyse .....	73
4.4.2	Expressionsstatus cpCK2 versus cyCK2.....	74
4.4.2.1	Expressionsstatus der CK2 im Blatt.....	74
4.4.2.2	Expressionsstatus in der Wurzel.....	75
4.4.3	Komplementation der CK2 Mutation mit <i>Gateway</i> -Klonierung.....	76
4.4.4	Transformation von pEG-CK2 in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und „floral dip“ .....	78
4.4.5	Phänotypische Untersuchung der komplementierten <i>ck2</i> -Pflanzen (TAP-CK2) .....	78
4.4.6	Wurzellängenvergleich WT/ <i>ck2</i> /TAP-CK2 .....	79
4.4.7	Expressionsstatus der komplementierten <i>ck2</i> -Pflanzenlinie .....	79
4.4.8	Phosphorylierung in den <i>ck2</i> - und TAP-CK2-Pflanzenlinien.....	81
4.4.9	Proteinnachweis der CK2 in Lysaten der WT, <i>ck2</i> und TAP- <i>ck2</i> -Linien .	82
4.4.9.1	Nachweis mit Antikörpern .....	82
4.4.9.2	Proteinnachweis der CK2 .....	84
4.4.9.3	Proteinnachweis der TAP-CK2 mittels multiple reaction monitoring (MRM) .....	88
4.4.10	Rekombinante CK2.....	89
4.4.11	Radioaktive Aktivitätsassays .....	92

4.4.12	CHIP .....	93
4.5	Ungerichtete Phosphoproteomics.....	97
4.5.1	Validierung der Titandioxid-Anreicherung von Phosphoproteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp- und <i>ck2</i> -Linien. ....	98
4.5.1.1	Blatt .....	98
4.5.1.2	Wurzel .....	98
4.6	Analyse der mittels Velos ermittelten MS-Daten.....	99
4.6.1	Phosphoproteomics im Blatt .....	99
4.6.2	Phosphoproteomics in den Wurzeln .....	105
4.6.3	Phosphorylierungsmuster WT/ Mutante.....	108
4.7	Tyrosinphosphorylierung .....	109
4.8	Gerichtete Phosphoproteomanalyse.....	111
4.9	Metabolomics .....	119
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
5.1	Charakterisierung der <i>ck2</i> -Linie .....	125
5.2	Komplementationslinie als Wiederherstellung des Phänotyps.....	126
5.3	Höherer Phosphorylierungsgrad in der Mutante. Ein Paradoxon oder logische Folge der Mutation?.....	127
5.4	Metabolitverteilung in der pflanzlichen Zelle .....	129
5.5	Der <i>knock-down</i> der CK2 führt zu veränderter Dunkelreaktion der Photosynthese.....	131
5.6	Einfluß des <i>knock-downs</i> auf die Lichtreaktion der Photosynthese .....	133
5.7	Höhere Photorespiration als Folge des CK2 <i>knock-downs</i> .....	134
5.8	<i>ck2 Knock-down</i> Mutante unter Stress .....	135
5.9	Warum konnte TOC 159 nicht mittels gerichteter Proteomics nachgewiesen werden?.....	136
5.10	<i>Inner membrane Protein Albino 3</i> (Alb3) als mögliches Substrat der CK2? .....	137

5.11 Weitere mögliche Substrate der Casein Kinase 2.....	137
5.12 Einfluß des CK2 <i>knock-downs</i> auf das Wurzelphosphoproteom .....	138
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>141</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>143</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>253</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

Abbildung 1: Stilisierte Darstellung eines Chloroplasten und seiner Bestandteile. ....	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Regulation der Kurzzeitadaptation von PSI und PSII. <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272810007632#f0010">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272810007632#f0010</a> .....	15
Abbildung 3: Detaillierte Darstellung des Calvin-Zyklus mit den dazugehörigen Zwischenprodukten und Enzymen. (copyright: www.metacyc.org) .....	17
Abbildung 4: Serinphosphorylierung. —B: zeigt den durch Enzym ausgelösten Protonentransfer. OH-Hydroxylgruppe, Mg <sup>2+</sup> - Magnesiumion. H <sup>+</sup> -Proton. Copyright ThermoScientific.....	19
Abbildung 5: Sequenzvergleich zwischen der Proteinsequenz der CK2 aus Arabidopsis thaliana (grün) und der humanen CK2(schwarz). Generiert mit NCBI Blast.....	22
Abbildung 6: Das Prinzip der chemisch-genetischen Methode (Hertz et al., 2010). A, Phosphorylierung durch WT-Kinase. B, Phosphorylierung durch modifizierte Kinase. C Nachweis der generierten Substrate. ....	27
Abbildung 7: Vektorkarte des pMALc5x-Plasmids. (Copyright: Addgene) .....	34
Abbildung 8: Vektorkarte des pDONR 223-Vektors. (Copyright: Addgene).....	35
Abbildung 9: Zielvektor für die Herstellung der komplementierten Linie GK615F11. (Copyright: Addgene) .....	36
Abbildung 10: Übersichtsdarstellung der A: BP- und B: LR-Reaktionen der Gateway Klonierung. Bearbeitete Grafik der Firma Invitrogen. ....	42
Abbildung 11: Struktur des Heparins aus alternierenden (A) Glucuronsäure oder deren C-5 Epimer, L-Iduronsäure und (B) D-Glucosaminresten R <sub>1</sub> = -H beziehungsweise -SO <sup>3</sup> -; R <sub>2</sub> = SO <sup>3</sup> - beziehungsweise -COCH <sub>3</sub> . ....	48
Abbildung 12: Blotaufbau .....	52
Abbildung 13: Übersicht der gerichteten Proteinquantifikation mittels multiple reaction monitoring (MRM). (A) Auswahl der für das Zielprotein spezifischer Peptide. (B) MRM-spezifische Produkte im MS/MS-Spektren. (C) Integrierte Peakflächen der Signale des Massenspektrums, die einen quantitativen Vergleich der Peakflächen des Zielproteins mit den stabilen Isotop-markierten Referenzpeptiden ermöglichen (Standards) ( aus Liebler und Zimmerman 2013). ....	60
Abbildung 14: (A) Die auf dem Chip mobilisierte Peptide sind über einen Linke mit dem Objektträger verbunden. Die Phosphorylierungsstelle befindet sich am zentralen Aminosäurerest des 15-meren Peptids. (B) Anordnung der Peptide auf dem Microarray. Der Microarray besteht aus 3 identischen Subarrays auf die 905 chloroplastidäre und Kontroll- Peptide gedruckt sind. In jedem Subarray ist jedes Peptid als Triplicat gedruckt. Ein Peptidspot besteht aus ~282 Millionen einzelner Peptidmoleküle, mit einem Durchmesser von 200 µm und 300 µm Zwischenspotabstand (Schonberg et al. 2014). ....	67
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Positionen der Gene der chloroplastidären CK2 (cpCK2) und cytosolischen CK2 (cyCK2) und die Positionen der T-DNA Insertionen.....	68
Abbildung 16: Homozygotie-PCR nach der hybriden Kreuzung der F1-Generation. 0,8 %iges (w/v) Agarosegel. 1-14: PCR mit FW_WT+RV_WT Primern. 15-28: PCR mit den FW_CK2+RV_CK2-Primern. Die unter der Nummer 10 und 11 geführten Pflanzen (schwarz eingerahmt) waren homozygot. ....	69
Abbildung 17: Wachstumsvergleich auf Erde zwischen Wildtyp, und ck2-Mutanten (GK615F11) im Kurztag-Phytoschrank (A) beziehungsweise die darauffolgende Blühphase im Gewächshaus (B). ....	70
Abbildung 18: A: Wurzellängenvergleich von Wildtyppflanze und GK615F11 nach 7 und 21 Tagen im Kurztag-Phytoschrank. B: Die Altersabhängigkeit der Wurzellängen der Wildtyppflanzen und der GK615F11 in Form eines Shapiro-Tests (N>30). ....	71
Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Chloroplasten. A: 2 Wochen alte Columbia 0 Wildtyp-Chloroplasten. B: 4 Wochen alte Columbia 0 Wildtyp-Chloroplasten. C: 2 Wochen alte ck2-Chloroplasten. D: 4 Wochen alte ck2-Chloroplasten. ....	72
Abbildung 20: C <sub>t</sub> -Werte der quantitativen real-time PCR in Abhängigkeit des Logarithmus der mRNA-Menge der Verdünnungsreihe, unter Verwendung spezifischer Primer für die Sequenz von Ubiquitin (schwarze Kreise als Kontrolle), chloroplastidäre CK2 (AT2G23070; weiße Kreise), cytosolische CK2 (AT2G23080; schwarze Dreiecke). ....	73
Abbildung 21: Expressionsstatus der cpCK2- und cyCK2-Gene im Blattgewebe der WT- und ck2-Pflanzen im Alter von 2 (A) und 4 (B) Wochen im Kurztag-Phytoschrank. ....	75
Abbildung 22: Expressionsstatus der cpCK2 und cyCK2 Gene im Wurzelgewebe von WT- und ck2-Pflanzen im Alter von 2 (A) bzw. 4 (B) Wochen im Kurztag-Phytoschrank.....	75
Abbildung 23: Homozygotie-PCR der komplementierten Pflanzen (0,8 % (w/v) Agarosegele). A: PCR mit den T-DNA Insertion spezifischen Primern. B: PCR mit den WT-Primern. C: PCR mit den tandem affinity purification (TAP)-spezifischen Primern. ....	77



Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der phänotypischen Ergebnisse der Komplementation. Wachstumsvergleich des Wildtyps, der ck2-Mutanten- (GK615F11) und komplementierter ck2- Pflanzen im Kurztag-Phytoschrank (Die Bilder des WT und der CK2 wurden bereits im Kapitel 4.3 gezeigt und wurden um TAP-CK2 ergänzt). .....	78
Abbildung 25: A. Wurzellängenvergleich der Wildtyppflanze, der GK615F11-Mutante und der komplementierten Mutante (TAP-CK2), nach 7 und 15 Tagen im Kurztag Phytoschrank. WT, GK615F11-Daten wurden bereits gezeigt und wurden um TAP-CK2 ergänzt. B. Die Altersabhängigkeit der Wurzellängen im Wildtyp, GK615F11-Mutante und in den komplementierten Pflanzen. ....	79
Abbildung 26: Genexpression der plastidären CK2 in WT, ck2-Mutanten und den komplementierten Mutanten (TAP-ck2) in 2 (A) und 4 (B) Wochen altem Blattgewebe im Vergleich zu der Genexpression des Nachbargens, der cytosolischen CK2 (23080). .....	80
Abbildung 27: Genexpression der plastidären CK2 (23070) im Wurzelgewebe von WT, Mutanten (ck2) und den komplementierten Mutanten (TAP-ck2) in 2 (A) und 4 (B) Wochen alten im Vergleich zu der Genexpression des Nachbargens, der cytosolischen CK2 (23080). .....	80
Abbildung 28: A: Western Blot mit pT78- Antikörper mit WT-, ck2- und komplementierten CK2-TAP-Pflanzen. Die Ernte und die Proteinextraktion erfolgte im Dunkeln, nach 16 Stunden Nacht. B die Ponceau S Protein-Färbung als Ladekontrolle (Proteinmenge: 50 µg). .....	81
Abbildung 29: A: Western Blot mit anti-CBP (calmodulinbindendes Protein)- Antikörper. B: Ponceaus-S-Färbung des Blots (aufgetragene Proteinmenge 50 µg). Mit dem Pfeil (~68 kDa wurde die Größe der gesuchten CK2 mit dem TAP-tag markiert).....	82
Abbildung 30: A Western Blot mit anti-IgG(Immunglobulin G)- Antikörper. B: Ponceaus-S-Färbung des Blots (aufgetragene Proteinmenge 50 µg). Mit dem Pfeil (~68 kDa wurde die Größe der gesuchten CK2 mit dem TAP-tag markiert). .....	83
Abbildung 31: Westen Blot mit anti-cpCK2-Antikörper. B: Ponceaus-S-Färbung der Proteine (aufgetragenen Proteinmenge 50 µg). .....	84
Abbildung 32: Spektrum des b-Ions IELD mit dem eingezeichneten schweren Peptid (HP beziehungsweise Hantel) und Normalpeptid (NP bzw Feder) im Wildtyp (lila), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (schwarz). .....	89
Abbildung 33: Klonierungsvektor mit der rekombinanten CK2 und den verwendeten Primern BamHI und NotI. ....	90
Abbildung 34: Teil 1: Überexpression und Reinigung der rekombinanten CK2. A = Marker. B vor der Induktion mit IPTG. C nach der Induktion mit IPTG. D auf die Amylose-säule aufgetragener Bakterienlysat. E Eluat von der Amylose Säule. F gereinigte MBP-CK2 (CK2 mit dem maltosebindendem Protein als tag) nach Gelfiltration, siehe mit dem schwarzen Pfeil markierte Bande. Teil 2: Ergebnisse des radioaktiven [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]-ATP-Aktivitätsassays in Gegenwart von G nur 0,5 µg rekombinante CK2, H-0,5 µg rekombinante CK2 mit 2 µg Casein als Substrat. I -Negativkontrolle mit 0,5 µg rekombinante CK2, 2 µg Casein und 1 mM GTP, J- Negativkontrolle mit 0,5 µg rekombinante CK2, 2 µg Casein und 15 µg/ml Heparin, K- Negativkontrolle mit 0,5 µg rekombinante CK2, 2 µg Casein und 1 mM ATP and L-10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Roter Pfeil markiert das positive Signal der Phosphorylierung des Casein mit [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]-ATP. ....	91
Abbildung 35: Autoradiogramm eines radioaktives 60 nM $\gamma$ - <sup>33</sup> P-ATP Aktivitätsassay. M- Marker; in allen Ansätzen ist je 0,45 µg gereinigte rekombinante CK2 erhalten. Zusätzlich kam hinzu: A-; B- 2 µg dephosphorylierten $\beta$ -Casein; C- 2 µg dephosphorylierten $\beta$ -Casein und 500 µM nicht radioaktives GTP; D-2 µg dephosphorylierten $\beta$ -Casein und 15 µg/ml Heparin; E: 2 µg dephosphorylierten $\beta$ -Casein und 2 mM kaltes ATP; F-2 µg dephosphorylierten $\beta$ -Casein und 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure; G- Wildtyp-Lysat (20 µg Chlorophyll); H- ck2-Lysat (20 µg Chlorophyll). ....	92
Abbildung 36: Mit unterschiedlichen Präparationen erhaltene Ergebnisse der Peptidchips. A, rekombinante pCK2; B, über Heparin-Sepharose angereicherte CK2 aus <i>Sinapis alba</i> , C, über Heparin-Sepharose angereicherte CK2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . Aus Schoenberg et al., 2014. ....	94
Abbildung 37: Anzahl der mit der „LTQ“ gefundenen Proteine im Wildtyp- (WT) und ck2-Linien vor (A) und nach (B) der Titandioxidanreicherung, in min. 2 biologischen Replikaten. ....	98
Abbildung 38: Anzahl der mit der LTQ gefundenen Proteine der Wurzel vor (A) und nach (B) der Titandioxidanreicherung, in min. 2 biologischen Replikaten. ....	98
Abbildung 39: Intensitätenvergleich möglicher Substrate, die mittels ungerichteter Proteomics ermittelt wurden. CP12: CP12 domain containing protein; FIB: Fibrillin; TK: Transketolase; RNJ: Ribonuklease J; NAD(P)-BP: NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein PSI-P: Photosystem I P Untereinheit, RCA: Rubiscoaktivase. (p<0,05).....	104
Abbildung 40: Weblogo aus dem Gesamtdatensatz der phosphorylierten Peptide aus WT-Blatt (A); ck2-Blatt (B); WT-Wurzel (C); ck2-Wurzel (D) .....	108
Abbildung 41: A Western Blot mit anti-Phosphotyrosin Antikörper. B die dazugehörige Proteinfärbung mit Ponceau S.1 menschliche Krebszellen (HEK293T) als Positivkontrolle, 2 A. thaliana WT-Stroma 50 µg, 3 A. thaliana ck2-Stroma 50 µg, 4 dephosphoryliertes WT-Stroma 50 µg, 5 dephosphoryliertes WT-	

Stroma ck2 50 µg, 6 WT-Stroma 100 µg, 7 ck2-Stroma 100 µg, 8 dephosphoryliertes WT-Stroma 100 µg, 9 dephosphoryliertes ck2-Stroma 100 µg. ....	110
Abbildung 42: A Western Blot eines anti-Phosphotyrosin Antikörper. B die dazugehörige Proteinfärbung mit Ponceau S.1 Casein als Negativkontrolle, 2 A. thaliana WT Stroma 30 µg, 3 A. thaliana ck2 Stroma 30 µg, 4-6 dephosphoryliertes Casein, 7 dephosphoryliertes WT-Stroma 30 µg, 8 dephosphoryliertes ck2-Stroma 30 µg. ....	110
Abbildung 43: Intensitätsvergleiche der in der ck2 mit geringerer Intensität detektierter möglicher Substrate der CK2. ....	116
Abbildung 44: Intensitätsvergleiche der in der ck2 mit höherer Intensität detektierter möglicher Substrate der CK2. ....	118
Abbildung 45: oPLS-DA-Scores von Wildtyp und ck2 (n=3). Peak-integrierte Flächendaten von xyz Metaboliten des zentralen Kohlen- und Energiestoffwechsels wurden für die Datenanalyse auf den Mittelwert der WT Gruppe normalisiert, log(10)-transformiert und Pareto-skaliert. Abkürzungen: R2X-kumulative Quadratsumme der Flächen gesamt (X, erklärt durch prinzipielle Komponenten (hier 1). Abkürzungen: WT-4W-I/II/III Wildtyp-4 Wochen alt-Replikatnummer. Entsprechend ck2. X= log-normalisierte Peakhöhen relativ zur Blattmenge. ....	119
Abbildung 46: oPLS-DA-Loadings (S-Plots) von Wildtyp und ck2 (n=3). Peak-integrierte Flächendaten von xyz Metaboliten des zentralen Kohlen- und Energiestoffwechsels wurden für die Datenanalyse auf den Mittelwert der WT Gruppe normalisiert, log(10)-transformiert und Pareto-skali. Rot: Metabolite des Calvin Zyklus. Beige: Metabolite, die eine allgemein hohe metabolische Aktivität anzeigen, z.B. TCA und Pools von AcCoA, Succ-CoA, CoA, Fettsäurebiosynthese (Malo-CoA, Glykolyse und Glykoneogenese (PEP). R2X[1]=0,553: Varianzabdeckung. ....	120
Abbildung 47: Expressionsraten von repräsentativen Metaboliten des Calvin-Zyklus. A: Ribulose-1,5-Bis-Phosphat; B: Sedoheptulose-1,7-Bis-Phosphat (S1,7P) in Wildtyp- und ck2-Pflanzen. mittels t-Test ermittelten signifikanten Daten sind mit *** markiert. ....	121
Abbildung 48: Der AMP-, GMP- (A) und ADP-Riboseabundanz (B) im Wildtyp und in ck2-Pflanzen. ....	121
Abbildung 49: Menge an ADP-Glucose als Vorläuferintermediat der Stärkebiosynthese in WT und in ck2-Pflanzen. ....	122
Abbildung 50: Metabolitabundanz von Glycin und Serin in WT (orange) und in ck2-Pflanzen (hellorange). ....	122
Abbildung 51: Die Abundanz der Reduktionsäquivalenten NADP bzw. NADPH im WT (orange) und der Mutante (hellorange). ....	123
Abbildung 52: Das Verhältnis zwischen NADPH/ATP im Wildtyp (dunkel) und ck2-Linie (hell). ....	123
Abbildung 53: Metabolitabundanz von A: Ribulose-5-Phosphat (RIBU5P) und Xylulose-5-Phosphat (XU5P) in Wildtyp (dunkelorange) und ck2 (hellorange) und B: Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) in Wildtyp (dunkelorange) und ck2 (hellorange). ....	123
Abbildung 54: Carboxylase-Reaktion und Oxygenase-Reaktion der Rubisco. (frei nach Stryer Biochemie S. 632). ....	134
Abbildung 55: schematischer Aufbau des TIC/TOC-Komplexes. (nach Richardson et al., 2014). ....	136
Abbildung 56: Nukleotidsequenz (5'-->3') der CDS (TAIR-Datenbank) und abgeleitete Aminosäuresequenz der AtCK2 (At2g23070) mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen. Der 4-Buchstabencode stellt die Nukleotidsequenz dar, die darunter liegenden Buchstaben die Aminosäuresequenz. ....	143
Abbildung 57: AT2G23070 104 bp PCR-Produkt. ....	144
Abbildung 58: AT2G23080 115 bp Produkt. ....	145
Abbildung 59: Originalschmelzkurven der quantitative RT-PCR für die Gene für Ubiquitin, AT2G23070 und AT2G23080. ....	148
Abbildung 60: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp. ....	234
Abbildung 61: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) in der ck2-Mutante. ....	235
Abbildung 62: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) in der komplementierten TAP-CK2 Pflanze. ....	236
Abbildung 63: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (schwarz oben), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (schwarz unten). ....	237
Abbildung 64: Spektrum b-Ion VDK mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila). ....	242
Abbildung 65: Spektrum b-Ion DFVVK mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila). ....	243

Abbildung 66: Spektrum b-Ion VDFVDK mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).	244
Abbildung 67: Spektrum b-Ion AVDFVDK mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).	245
Abbildung 68: Spektrum b-Ion VPEAVDFVDK mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).	246
Abbildung 69: Spektrum b-Ion AVPEAVDFVDK mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).	247
Abbildung 70: Sequenzierung des Vektors pMALc5x mit rekombinanter CK2. Forwärtssprimer 5' → 3'-Richtung.	248
Abbildung 71: Sequenzierung des Vektors pMALc5x mit rekombinanter CK2. Rückwärtsprimer 5' → 3'-Richtung.	250

Tabelle 1: Für die Klonierungen verwendeten Primer in 5' → 3' Ausrichtung. T: Annealingtemperatur	36
Tabelle 2: in dieser Arbeit verwendete Antikörper.	38
Tabelle 3: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes. FW Primer =Vorwärtsprimer, RW= Rückwärtsprimer.	39
Tabelle 4: verwendetes PCR-Programm.	39
Tabelle 5: das verwendete qPCR-Programm.	40
Tabelle 6: Übersicht der Arbeitsschritte bei der Chloroform/Methanol-Fällung	45
Tabelle 7: benötigte Komponenten für ein 200 µl Stroma-Dephosphorylierungsansatz.	47
Tabelle 8: Zusammensetzung des Trenngels (ausreichend für 3 Gele)	51
Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammelgels (ausreichend für 4 Gele)	51
Tabelle 10: Übersicht der Arbeitsschritte eines In-Lösungsverdaus.	53
Tabelle 11: Puffer und Lösungen für den tryptischen In-Gel-Verdau.	55
Tabelle 12: Der Verlauf des Acetonitrilgradienten während der Messung mit LTQ-XL.	58
Tabelle 13: LC-Methode. Als Lösung A H <sub>2</sub> O (HPLC-Grade, mit 0,1 % (v/v) FA) und als Lösung B Acetonitril (mit 0,1 (v/v) % FA).	59
Tabelle 14: eingestellte Auswerteparameter des Programms „Proteome Discoverer“. FDR= false discovery rate.	61
Tabelle 15: Auswertungsparameter bei Verwendung von „MaxQuant“. FDR= false discovery rate.	61
Tabelle 16: Parameter für die Prozessierung der Rohdaten mittels Programm PLGS.	62
Tabelle 17: Parameter für den Datenbankabgleich von dem Programm PLGS 3.0.1.	63
Tabelle 18: Effizienz der für die qPCR verwendeten Primer. Ubiquitin dient als Expressionskontrolle. AT2G23070 plastidäre CK2, AT2G23080 cytosolische CK2.	74
Tabelle 19: Detektierte Proteine (mit AT-Nummern und Beschreibung) in den mittels Heparin-Sepharose angereicherten 14d alten Wildtyppflanzen. Das Protein von Interesse (CK2 mit der AT2G23070 ist in rot abgebildet). Die gemessene Menge an CK2 betrug 1,3 fmol.	85
Tabelle 20: Ergebnisse der Chip-Auswertung der phosphorylierten Peptide, dazugehörigen ATG-Nummern und Beschreibung und in wie vielen Replikaten und mit welcher Probe die Peptide gefunden wurden. Die Durchführung des Experiments erfolgte zusammen mit Anna Schönberg. Die Auswertung der Daten wurde von Anna Schönberg durchgeführt. Aus Schoenberg et al., 2014.	95
Tabelle 21: Phosphopeptide, die ausschließlich in Blättern vom 2 Wochen alten Wildtyppflanzen nachgewiesen wurden. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. In Farbe Ocker hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.	100
Tabelle 22: Proteine, die aufgrund der Konsensussequenz ihres ausschließlich in WT-Proben gefundenen Phosphopeptids als potentielle CK2 Substrate in Frage kommen.	101
Tabelle 23: In Blättern vom 2 Wochen alten, ausschließlich ck2-Pflanzen gefundenen Phosphopeptide. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. Farbig hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.	102
Tabelle 24: Proteine, die aufgrund der Konsensussequenz ihres, ausschließlich in ck2-Proben gefundenen Phosphopeptids als potentielle ck2 Substrate in Frage kommen	103
Tabelle 25: Phosphopeptide, welche wohl im Wildtyp als auch in der ck2, jedoch mit unterschiedlicher Intensität detektiert wurden.	104
Tabelle 26: In Wurzeln vom 2 Wochen alten, ausschließlich WT-Pflanzen gefundenen Phosphopeptide. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. Farbig hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.	106
Tabelle 27: In Wurzeln von 2 Wochen alten, ausschließlich ck2-Pflanzen gefundenen Phosphopeptide. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. Farbig hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.	107

Tabelle 28: Inclusion list Teil 1. Die in der Peptidsequenz kleingeschriebene Aminosäuren liegen phosphoryliert vor. Grün steht für eindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure, Rot für eine nichteindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure.....	112
Tabelle 29: Inclusion list Teil 2. Die in der Peptidsequenz kleingeschriebene Aminosäuren liegen phosphoryliert vor. Grün steht für eindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure, Rot für eine nichteindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure.....	113
Tabelle 30: Proteine und die dazugehörigen Phosphopeptide, die ausschließlich im WT und TAP-CK2 phosphoryliert vorlagen. ....	113
Tabelle 31: Proteine, die ausschließlich im Wildtyp phosphoryliert vorlagen. ....	114
Tabelle 32: Proteine mit den dazugehörigen Peptiden, die in allen drei Linien, jedoch in der ck2-Linie mit verringerter Intensität, nachgewiesen wurden.....	115
Tabelle 33: Proteine mit den dazugehörigen Peptiden, die in allen drei Linien, jedoch in der ck2-Linie mit höherer Intensität, nachgewiesen wurden.....	117
Tabelle 34: Metabolitverteilung in unterschiedlichen Kompartimente der pflanzlichen Zelle nach (Szecowka et al., 2013). Es wurde angenommen, dass das 2PGA (2 Phosphoglycerat) nur im Cytosol vorkommt und seine Menge 10% der 3PGA-Menge darstellt. Subzelluläre Verteilung (%) wurde unter Verwendung eines 3 Kompartimenten Modells erstellt (Plastid, Cytosol, Vakuole). Bei mit "a" markierten Metaboliten wurde ein 2-Kompartimenten Model benutzt. n.d. nicht definiert. ....	130
Tabelle 35: Zum Peptidchip Design verwendeten Phosphopeptide als Liste der Publikationen in denen diese zuerst als Phosphorylierungsziele der CK2 erwähnt sind. ....	149
Tabelle 36: Liste auf dem micorarray ChloroPhos 1.0 mobilisierter Peptide. ....	151
Tabelle 37: für die LC-MS Messungen verwendete LC-Parameter. ....	228
Tabelle 38: MS Parameter für die gerichtete Analyse hydrophiler und semipolarer Metabolite mit (-)ESI-SWATH-MS/MS.....	229
Tabelle 39: Sequenz der für die MRM-Methode verwendeten schweren Peptide der CK2 (At2g23070) .....	232
Tabelle 40: In Silico Fragmentierung des ersten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.....	233
Tabelle 41: In Silico Fragmentierung des zweiten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.....	238
Tabelle 42: In Silico Fragmentierung des dritten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.....	239
Tabelle 43: In Silico Fragmentierung des vierten für die MRM- Methode verwendeten Peptids. ....	240

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Ursprung des Lebens

Die Fähigkeit der Pflanzen aus Lichtenergie und Kohlenstoffdioxid Sauerstoff zu produzieren, machte sie zu einem essentiellen Faktor des menschlichen Lebens. Von der einzelligen Grünalge bis zur Eiche, das Grundprinzip der Photosynthese ist dasselbe. Johannes Brahms widmete sein drittes Streichquartett Theodor Wilhelm Engelmann, der in Musik den inneren Ausgleich zu seiner wissenschaftlichen Karriere fand. Engelmann war derjenige, der im Jahr 1882 mit einem Bakterienversuch zeigte, dass der Optimalbereich für die Photosynthese in dem langwelligen Rot liegt, sowie im eher kurzwelligen Blau. Dazwischen (im Bereich von Grün und Gelb) sank die Photosyntheserate auf ca. 10%. Dazu nutzte Engelmann einen durch Prisma zerlegten Lichtstrahl, den er auf einen eingespannten Faden der Alge *Spirogyra* scheinen ließ, auf den vorher sauerstoffliebende Bakterien platziert wurden. In Abhängigkeit von der auf den Algenfaden treffenden Wellenlänge des Lichts produzierten die Chloroplasten mehr oder weniger Sauerstoff, weshalb sich die Bakterien unterschiedlich stark vermehrten. Mit diesem Versuch zeigte Engelmann weiterhin, dass es die Chloroplasten waren, in denen die Photosynthese stattfand (Engelmann 1882). Alle eukaryotischen photosynthetisch-aktiven Organismen führen die Photosynthese isoliert in speziellen Organellen, den Chloroplasten, durch.

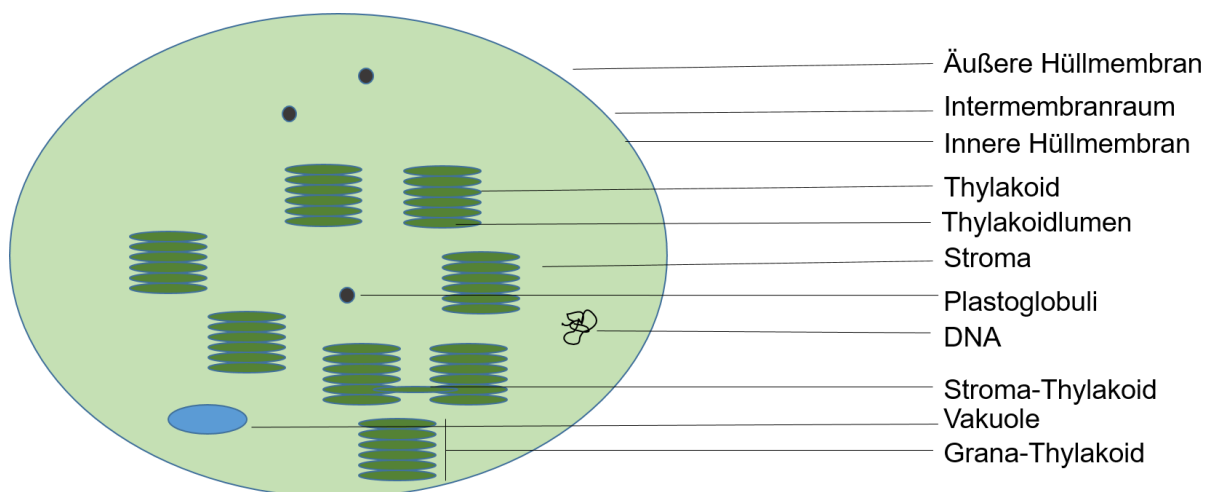


Abbildung 1: Stilisierte Darstellung eines Chloroplasten und seiner Bestandteile.

Ein Chloroplast wird durch zwei Doppelmembranen begrenzt (Abbildung 1). In Grünalgen und höheren Pflanzen ist das Chlorophyll an Proteine der inneren Membran

des Chloroplasten gebunden. Enzyme des Stroma, im Bereich des Chloroplasten außerhalb der Thylakoide, katalysieren die Kohlenstoffreduktion, die Zucker aus Kohlenstoffdioxid produzieren (Taiz *et al.*, 2015). Im Inneren der Chloroplasten befinden sich so genannte Thylakoidstapel, die entweder durch Lamellen miteinander verbunden sind oder sich als Granum im Stroma befinden (siehe Abbildung 1). Die dem Stroma zugewandten Teile des Photosyntheseapparates sind hydrophil. Die Bestandteile, die sich in der Thylakoidmembran befinden, sind lipophil, somit müssen die Transportvorgänge von Stroma ins Innere der Thylakoide über *Carrier*-Proteine oder Membrankanäle erfolgen. Die unterschiedliche Komplexität der photosynthetisch aktiven Organismen, zeigt sich auch in der Anzahl der vorhandenen Chloroplasten. *Chlamydomonas reinhardtii* (die oben erwähnte Grünalge) zum Beispiel besitzt nur einen einzigen Chloroplasten pro Zelle. Ein Laubblatt mit etwa 70 Millionen Zellen enthält rund 5 Milliarden Chloroplasten und entsprechend 600 Milliarden Moleküle Chlorophyll. Je zwei der etwa 250-300 Chlorophyllmoleküle pro Chloroplast bilden so genannte spezielle Paare. Das Chlorophyll des Photosystems I (PSI) absorbiert das Licht bei 700 nm, das Chlorophyll des Photosystems II (PSII) absorbiert bei 680 nm. Die Chlorophyllpaare werden als P700 und P680 bezeichnet und sind chemisch identisch (Chlorophyll-a). Als Photosystem werden die Lichtsammel-Komplexe (LHC) und Lichtsammel-Fallen bezeichnet, die in der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Berg *et al.*, 2011). Die Photosynthese wird in zwei getrennte Phasen gegliedert, die Lichtreaktion, welche die Lichtenergie zur Synthese von NADPH und ATP nutzt und in den Thylakoiden stattfindet und die Dunkelreaktion, eine Licht unabhängige Reaktion, die NADPH und ATP nutzt um die Synthese von Kohlenhydraten aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O voranzutreiben und im Stroma durchgeführt wird.

## 1.2 Die Lichtreaktion der Photosynthese

Die Lichtreaktion der Photosynthese in den grünen Pflanzen hängt von dem Wechselspiel der oben erwähnten membrangebundenen, lichtempfindlichen Komplexe, Photosysteme I und II ab. Jedes Photosystem besteht aus einem Reaktionszentrum, welches zwei Chlorophyll-a-moleküle und einem primären Elektronenakzeptor enthält und von mehreren LHCs umgeben wird. Die LHCs sind eine Ansammlung vieler Transmembranproteine, welche entweder dem PSI (LHCI) oder PSII (LHCII) zugeordnet sind. Die PSI- und PSII- Komplexe agieren in Serie und sind über einen Plastochinon-Pool (PQ), Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*- Komplex und Plastocyanin innerhalb der Elektronentransportkette miteinander verbunden. Das Photosystem I,

das von Licht mit Wellenlängen unterhalb von 700 nm angeregt wird, benötigt aus der Lichtenergie stammende energiereiche Elektronen, um Reduktionsäquivalente in Form von NADPH zu produzieren. Die Elektronen die zur Reduktion eines Moleküls NADPH benötigt werden, stammen von zwei Molekülen Wasser aus dem Photosystem II. Da die Komplexe von PSI und PSII einen unterschiedlichen Aufbau besitzen und durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen aktiviert werden, kann ihre Anregung zu einer Disbalance unter wechselnden Lichtstärken führen (Lemeille und Rochaix, 2010, Pesaresi *et al.* 2009) .

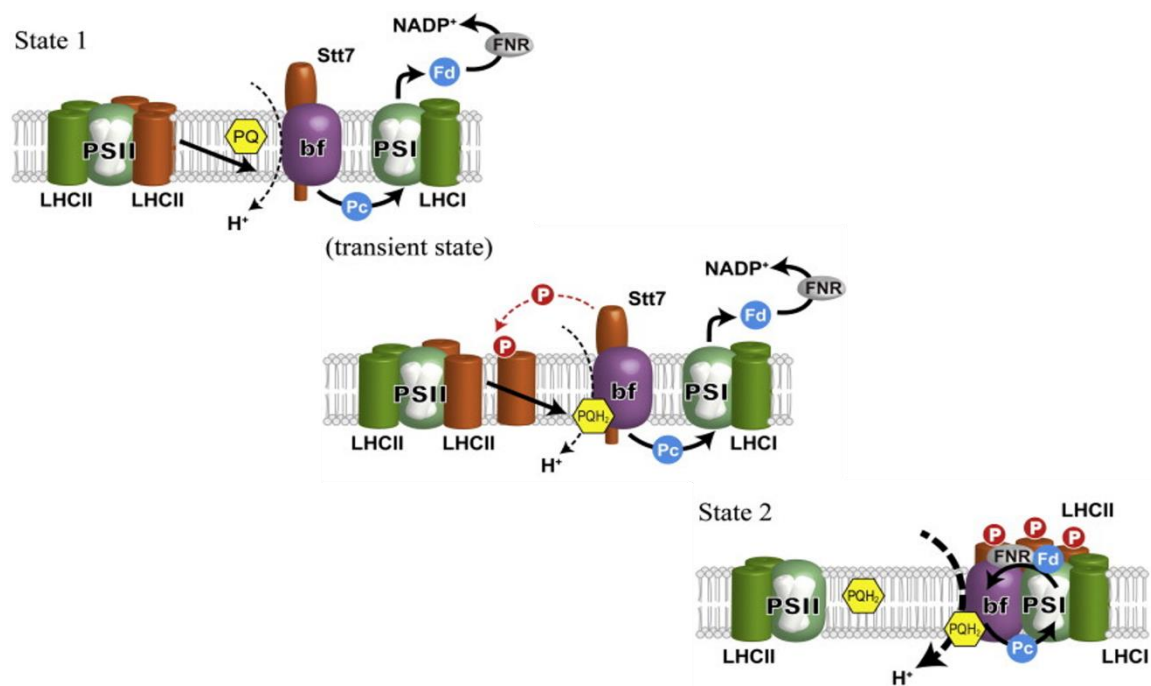


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Regulation der Kurzzeitadaptation von PSI und PSII.. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272810007632#f0010>

Wenn PSII durch Licht der Wellenlänge von 680 nm angeregt wird, so ist der Plastochinon-Pool reduziert. An der Andockstelle für Plastochinon ( $PQH_2$ ) zu der  $Q_0$ -Seite des Cytochrom- $b_6/f$ -Komplexes wird eine Proteinkinase aktiviert, die den Lichtsammelkomplex II (LHC II) phosphoryliert. Das Ereignis führt zur Dissoziation von LHC II des PS II und seiner Migration zu PSI, was wiederum das Gleichgewicht zwischen den zwei Photosystemen wiederherstellt (*state 2*). Dieser Prozess ist reversibel, da eine bevorzugte Anregung des PSI durch rotes Licht erreicht wird, womit die Dephosphorylierung von LHC II vollzogen wird und die Assoziation mit PSII erfolgt (*state 1*). Dieser Prozess der Balance wird *state transition* genannt (Abbildung 2) und ist eine Kurzzeitadaptation auf die wechselnden Lichtbedingungen. Wenn die bevorzugte Anregung des PSII oder PSI über einen längeren Zeitraum andauert, führt es zu einer Langzeitadaptation, die zur Änderung der Anzahl der Proteine der beiden

Photosysteme führt und somit eine Neuangleichung der Stöchiometrie der beiden Photosysteme bewirkt. Diese so genannte Langzeitantwort oder *long-term response* (LTR) wird durch Signalnetzwerke erreicht, in die eine koordinierte Genexpression im Nukleus und Chloroplasten involviert ist (Pfannschmidt 2003).

Photosynthese findet in Blättern statt, die Kohlenhydrate im Überfluss erzeugen, auch für die Gewebe, die nicht in der Lage waren Assimilate selbst zu produzieren (Wurzeln, Blüten, Früchte ohne Chloroplasten).

### **1.3 Die Dunkelreaktion der Photosynthese**

Während der Dunkelreaktion wird der Kohlenstoffdioxid im Zuge des Calvin-Zyklus fixiert. Die Übersicht über die einzelnen Reaktionen ist in der Abbildung 3 zusammengefasst.



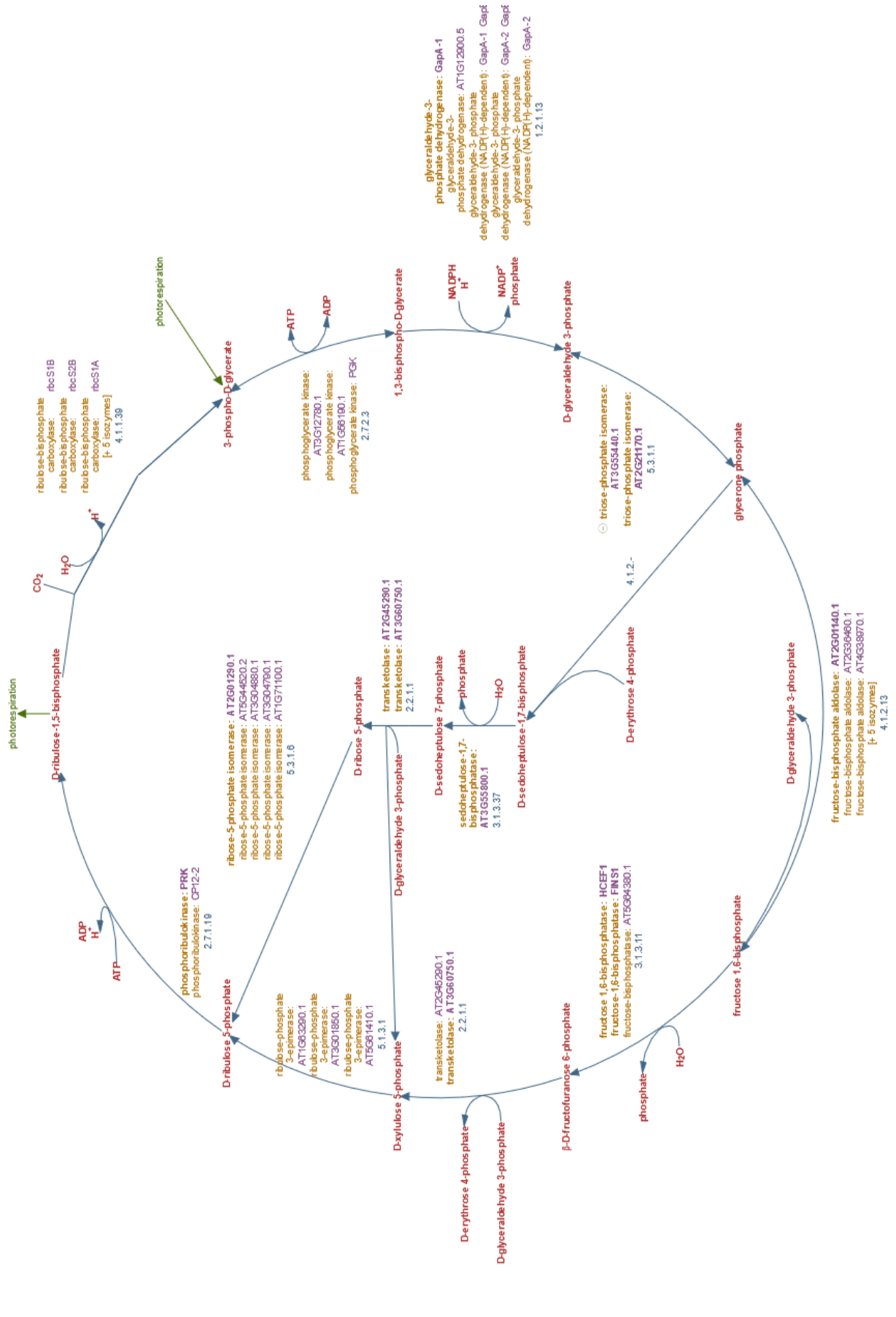


Abbildung 3: Detaillierte Darstellung des Calvin-Zyklus mit den dazugehörigen Zwischenprodukten und Enzymen. (copyright: www.metacyc.org)

In der ersten Phase des Zyklus werden 3 Moleküle Ribulose-Bisphosphat und 3 Moleküle Kohlenstoffdioxid zu 6 Molekülen Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Verbrauch von 9 Molekülen ATP und 6 Molekülen NADPH, aus der Lichtreaktion, gebildet. In der zweiten Phase werden die Atome von 5 Moleküle Glycerinaldehyd-3-Phosphat zum Dihydroxyacetonphosphat isomerisiert, damit die am Anfang des Zyklus aufgebrauchte 3 Moleküle Ribulose-3-Bisphosphat gebildet werden können. Das Glycerinaldehyd-Phosphat wird zur Synthese von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren genutzt. Die Kohlenstofffixierung ist ein kleiner Schritt der Photosynthese auf dem sich das komplette Leben aufbaut. Das Verständnis dieser Regulation ist eine grundlegende Herausforderung der Biochemie bei der Frage nach der Erforschung des Lebens. Die Verteilung der Metabolite des Kohlenstoffwechsels könnten grundlegend zum Einblick in die Regulation der Dunkelreaktion der Photosynthese beitragen. Die Regulation der Zwischenschritte des Calvin-Zyklus, an denen Kinasen beteiligt sind, erfolgt unter anderem durch Phosphorylierung.

#### **1.4 Proteinphosphorylierung als eine Form der posttranslationalen Modifikation**

Die Regulation der Kinasen der Photosynthese geschieht durch die Phosphorylierung an Aminosäuren Serin oder Threonin. Die Phosphorylierung an Aminosäure Tyrosin ist bei Pflanzen sehr selten (Lu et al. 2015). Proteinphosphorylierung ist neben der Glykosylierung und Acylierung eine wichtige Form der posttranslationalen Modifikation in eukaryotischen Zellen, die eine Vielzahl an zellulären Prozessen steuert. In Pflanzen ist die Phosphorylierung der Membranproteine hauptsächlich verantwortlich für die Regulation der physiologischen Prozesse, die mit lichtinduzierter Änderung des Redoxzustandes verbunden sind. Die Phosphorylierung von Proteinen wird durch spezielle Enzyme, die Kinasen, katalysiert. Somit spielt die Identifikation der Kinasen, ihrer Substrate und Phosphorylierungsstellen eine Schlüsselrolle im Verständnis zellulärer Prozesse und ihrer Netzwerke. Dabei wird eine Phosphatgruppe von ATP (Adenosintriphosphat) auf einen Aminosäurerest, in der Regel Serin oder Threonin, seltener Tyrosin, übertragen. Die Phosphatasen katalysieren die Rückreaktion, das Entfernen der Phosphatgruppe vom Protein. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppe, kommt es in Folge der Phosphorylierung zur Konformationsänderung des Proteins. Werden andere Moleküle, wie Zucker oder Nukleotide phosphoryliert, so dient es der Bereitstellung der chemischen Energie. Polyphosphate dienen im Zellstoffwechsel dem Zwischenspeichern und Austausch der

Energie. In der Abbildung 4 ist die chemische Reaktion der Phosphorylierung am Beispiel einer Serinphosphorylierung dargestellt. Dabei kommt es nach einem enzymkatalysierten Protonentransfer von der Hydroxylgruppe (-OH) des Serins zu einem nukleophilen Angriff der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des Adeninriphosphats, wobei es zum Transfer der Phosphatgruppe auf Serin und zur Bildung von Phosphoserin, ADP und Freisetzung eines Protons.

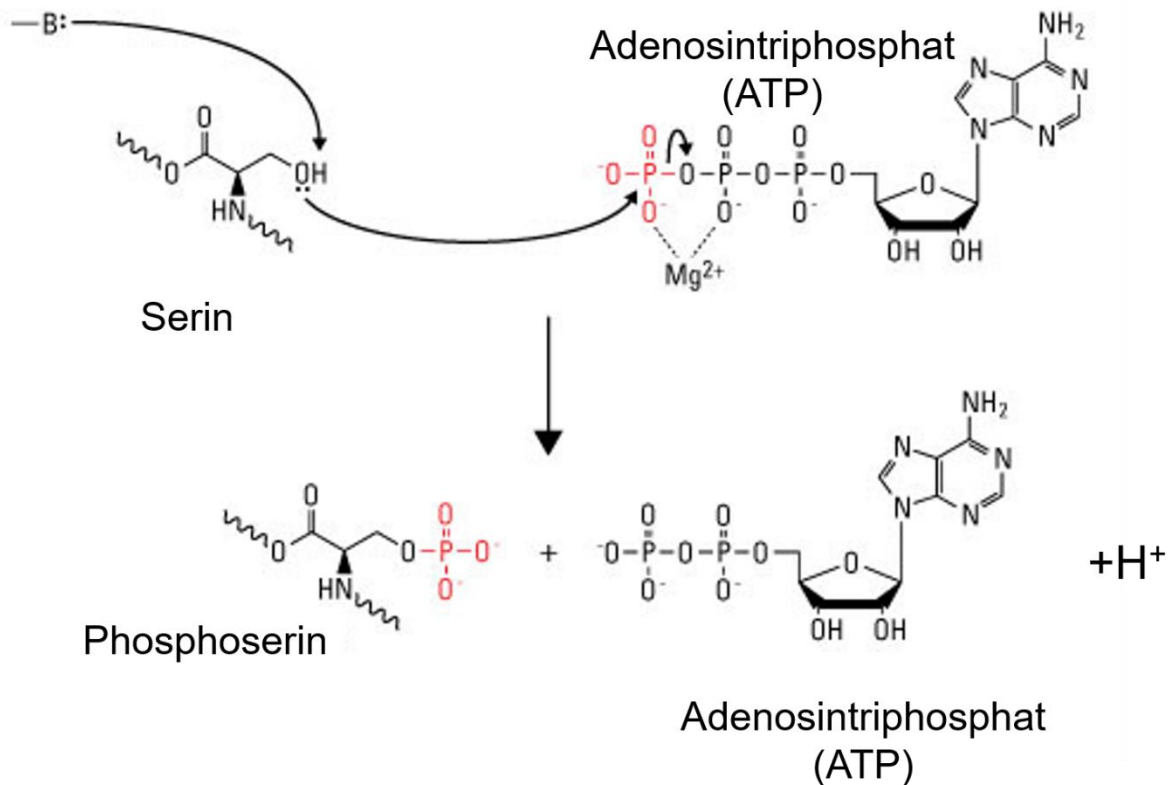


Abbildung 4: Serinphosphorylierung.  $-B:$  zeigt den durch Enzym ausgelösten Protonentransfer. OH-Hydroxylgruppe,  $Mg^{2+}$ -Magnesiumion.  $H^+$ -Proton. Copyright ThermoScientific.

Vor 10 Jahren waren bereits über 17000 Kinasen verschiedener Spezies bekannt, knapp 10000 davon Proteinkinasen (Cheek *et al.*, 2002). Vom menschlichen Genom werden etwa 500 Enzyme des Typs „Proteinkinase“ codiert; sie bilden das „Kinom“ (Manning *et al.*, 2002), im Reis waren es über 1400 Kinasen (Dardick *et al.*, 2007), in *Arabidopsis thaliana* über 1000 (Zulawski *et al.*, 2014). Alle Kinasen katalysieren denselben Reaktionstyp, indem sie Phosphat von ATP auf bestimmte Aminosäurereste eines Proteins übertragen. Da ein Protein von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden kann, besitzt jede Kinase mehrere Substratmoleküle (geringe Substratspezifität). Exprimierte Proteine werden durch Kinasen phosphoryliert und werden dadurch zum Phosphoprotein. Die Gesamtheit der

Phosphoproteine wird als Phosphoproteom bezeichnet. Da die biologische Aktivität durch die Phosphorylierung signifikant beeinflusst werden kann, ist es eine der molekularbiologischen Herausforderungen, die physiologischen Substrate der Kinasen zu identifizieren und den Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivität von Proteinen zu bestimmen.

### **1.5 Casein Kinase 2 (EC.2.7.11.1)**

Die Casein Kinase 2 wurde 1954 zusammen mit der Casein Kinase 1 entdeckt (Burnett und Kennedy 1954). Burnett und Kennedy extrahierten Mitochondrien aus der Rattenleber, um zu untersuchen, ob die darin enthaltenen Enzyme die Fähigkeit besitzen Proteine zu phosphorylieren. In dem Fall war das Protein der Wahl Casein. Die dabei gefundenen Kinasen wurden später Casein Kinase 1 und Casein Kinase 2 genannt, wobei es von Anfang an klar war, dass das Casein kein *in-vivo*-Substrat der Kinase darstellt.

Die plastidäre CK2 ist eine hoch konservierte, pleiotrope Ser/Thr-Kinase mit einer Vielzahl an Substraten. (Allende und Allende 1995; Pinna 2002; Litchfield 2003; Meggio und Pinna 2003). Der starke Pleiotropismus würde auch die konstitutive Aktivität der CK2 erklären. Diese beiden Eigenschaften zusammen zeigen, warum die CK2 nicht mit klassischen Proteinkinasen verglichen werden kann, die nur sehr spezifisch an- und ausgeschaltet werden und nur in bestimmten Schritten der Signalkaskaden eine Rolle spielen. Die CK2 scheint eine globale Rolle in der Zelle zu haben, wo sie in einer Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse, wie Expression der Markergene, RNA Synthese, Proteinsynthese und Proteindegradation, Differenzierung, Apoptose, Thermotoleranz involviert ist (Guo *et al.*, 2001; Padmanabha *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 2002; Litchfield 2003; Wang *et al.*, 2014). Die meisten identifizierten Substrate sind nukleäre Proteine, die in DNA/RNA-Assoziation involviert sind oder zelluläre Proteine, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Meggio und Pinna 2003). Es hätte somit wenig Sinn ihre Wirkungsweise in Bezug auf eine einzelne Funktion zu untersuchen.

Die CK2 ist ein Heterotetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) aus zwei katalytischen ( $\alpha$ -) und zwei regulatorischen ( $\beta$ -) Untereinheiten. Neben dieser Hauptform kommt die  $\alpha$ -Untereinheit der CK2 (42 kDa) als Monomer jedoch aktiv auch ohne die regulatorische  $\beta$  Untereinheit vor (Pinna, 1997). Die CK2 phosphoryliert Serin- und Threoninreste und bevorzugt dabei Substrate, die die Konsensussequenz S/TXXD/E besitzen. Eine negativ geladene Aminosäure an der dritten Stelle C-terminal von der

## Einleitung

Phosphorylierungsstelle ist notwendig und gleichzeitig ausreichend für eine Phosphorylierung durch CK2. Die negativ geladene Seitenkette an der Position kann auch ein phosphoryliertes Serin oder Threonin sein. Die CK2 kann im Unterschied zu den meisten anderen bekannten Kinasen sowohl ATP als auch GTP als Phosphatdonor benutzen (Rodnight *et al.*, 1964). Diese duale Co-Substratspezifität ist ein charakteristisches Merkmal dieser Kinase. Die Aktivität der Übertragung der Phosphatgruppe wird durch keine der bekannten Regulationsmechanismen kontrolliert. Die CK2 ist in eine Fülle zellulärer Prozesse eingebunden, die Auswirkungen auf die Vitalität einer Zelle haben. Studien belegen, dass die Fehlregulation der Aktivität der humanen CK2 zu Tumorwachstum führen kann (Vilk *et al.*, 2008).

Es besteht über 76% Homologie in der Aminosäuresequenz zwischen der humanen  $\alpha$ -Untereinheit der CK2 und der aus *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 5). Diese Sequenzübereinstimmungen zeugen von der starken evolutionären Bedeutung der CK2 in den eukaryotischen Zellen.

## Einleitung

Query	98	APSKARVYADVNVVRPKDYWDYESLAVQWGVQDDYEVVRKVGGRGKYSEVFEIGHATDNEK	157
		PS+ARVY DVN RP++YWDYES V+WG QDDY++VRK+GRGKYSEVFE I+ T+NEK	
Sbjct	5	VPSRARVYTDVNTHRPREYWDYESHVVEWGNQDDYQLVRKLGGRGKYSEVFEAINITNNEK	64
Query	158	CVIKILKPVKKKKIKREIKILQNLCCGPNIVKLLDIVRDQQSKTPSLIFEHVNNKDFKVL	217
		V+KILKPVKKKKIKREIKIL+NL GGPNI+ L DIV+D S+TP+L+FEHVNN DFK L	
Sbjct	65	VVVKILKPVKKKKIKREIKILENLRGGPNIITLADIVKDPVSRTPALVFEHVNNDFKQL	124
Query	218	YPTLSDYDVRYYIFELLKALDFCHSRGIMHRDVKPHNVMIDHEQRKLRLIDWGLAEFYHP	277
		Y TL+DYD+R+Y++E+LKALD+CHS GIMHRDVKPHNVMIDHE RKLRLIDWGLAEFYHP	
Sbjct	125	YQTLTDYDIRFMYEILKALDYCHSMGIMHRDVKPHNVMIDHEHRKLRLIDWGLAEFYHP	184
Query	278	GKEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDLWSLGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDYDQLVK	337
		G+EYNVRVASRYFKGPELLVD Q YDYSLD+WSLGCM A MIFRKEPFF+GHNDYDQLV+	
Sbjct	185	GQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCM LASMIFRKEPFFHGHNDYDQLVR	244
Query	338	IAKVLGTDELNAYLNKYRIELDPNLTSLVGRHSRKPWTKFINSENQHLAVPEAVDFVDKL	397
		IAKVLGT++L Y++KY IELDP ++GRHSRK W +F++SENQHL PEA+DF+DKL	
Sbjct	245	IAKVLGTEDLYDYIDKYNIELDPRFNDILGRHSRKRWERFVHSENQHLVSPALDFLVDKL	304
Query	398	LRYDHQERPTAKEAMAHYPYFYPI	420
		LRYDHQ R TA+EAM HPYFY +	
Sbjct	305	LRYDHQSRLTAREAMEHPYFYTV	327

Abbildung 5: Sequenzvergleich zwischen der Proteinsequenz der CK2 aus *Arabidopsis thaliana* (grün) und der humanen CK2 (schwarz). Generiert mit NCBI Blast.

Im humanen Genom konnten drei Gene für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit und ein Gen für die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit gefunden werden (Wirkner *et al.*, 1994; Wirkner *et al.*, 1998; Ackermann *et al.*, 2005). Bei Pflanzen werden die jeweiligen Untereinheiten durch mehrere Gene codiert (Sugano *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Riera *et al.*, 2001; Espunya *et al.*, 1999; Espunya *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2006) wodurch eine stärkere Heterogenität erreicht wird. Verschiedene Studien wurden zur Untersuchung der CK2-Funktion in Pflanzen durchgeführt: Mais (Riera *et al.*, 2001), Tabak (Salinas *et al.*, 2001), *Arabidopsis* (Sugano *et al.*, 1999), Weizen (Kato *et al.*, 2002) und Senf (Ogrzewalla *et al.*, 2002). Obwohl die identifizierten CK2 Substrate nicht so zahlreich sind wie die in humanen Organismen, konnte trotzdem eindeutig gezeigt werden, dass die CK2 in eine Reihe essentieller physiologischer Prozesse wie Signaltransduktion, circadianer Rhythmus, Transkription, Transation, Zellzyklus, Ca<sup>2+</sup>-Speicher und salicylsäureregulierte Abwehr (Espunya *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Sugano *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2001; Riera *et al.*, 2001; Meggio und Pinna 2003).

In pflanzlichen Zellen wurde die CK2 zunächst im Cytosol und im Nucleus nachgewiesen (Riera *et al.*, 2001). Im Jahr 2002 konnte die CK2 in Chloroplasten von Senf lokalisiert werden (Ogrzewalla *et al.*, 2002). Aufgrund der sehr geringen Abundanz konnte die CK2 in *Arabidopsis thaliana* erst sieben Jahre später mithilfe von Massenspektrometrie verlässlich nachgewiesen werden (Baginsky und Gruissem 2009). Die Arbeitsgruppe um Salinas *et al.* untersuchte das Genom der *Arabidopsis thaliana* nach  $\alpha$ - beziehungsweise  $\beta$ - Untereinheiten der kodierenden Genen der CK2 und publizierten 2006 ihre Ergebnisse: sie fanden vier Gene für die  $\alpha$ - und vier Gene für die  $\beta$ -Untereinheiten. Die Expressionsanalysen zeigten, dass die CK2-Gene in Blütenständen, Stielen, Blättern und Wurzeln exprimiert werden. Das Expressionsniveau der Gene war dabei ähnlich. Lediglich die Gene für die chloroplastidäre  $\alpha$ -Untereinheit waren in allen Geweben erhöht exprimiert. In den Chloroplasten konnte keine CK2  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert werden.

## 1.6 Proteinphosphorylierung und CK2

Proteinphosphorylierung kontrolliert wichtige Schritte der Effizienz des Elektronentransports in Chloroplasten. Die Gesamtheit aller phosphorylierten Proteine einer pflanzlichen Zelle stellt das Phosphoproteome dar. Die Erweiterung der Kenntnisse über die Signalübertragung während der Phosphorylierung von Proteine ist für das Verständnis der Regulation dieser Übertragung unerlässlich. Unter Verwendung der hochauflösenden Massenspektrometrie wurde das Phosphoproteome der Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* charakterisiert und offenbarte vier Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich der *state transition* 7 (STN7) (Reiland *et al.*, 2009). Weiterhin schlug Reiland *et al.* (2009) vor, dass eine der Phosphorylierungsstellen der STN7, eine für Kurzzeitadaptation bei veränderten Lichtbedingungen beteiligte thylakoidassoziierte Kinase, Substrat der Casein Kinase 2 (CK2) sei. Die CK2 ist unter anderem für die Regulation der Transkription bekannt (Link 2003). Die große Anzahl an Substraten benötigt ein hohes Maß an Feinregulation. Einige regulatorische Funktionen der chloroplastidären CK2 sind exklusiv. Zum Beispiel gibt es Hinweise einer lichtabhängige Phosphorylierung der RNP's (ribonukleäre Proteine) während der Umwandlung des Etioplasten zu einem Chloroplasten (Kleffmann *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung der RNPs schwächt ihre Wechselwirkung mit der mRNA des Plastids und löst, wenn höhere Translationsraten der Photosynthesepoteine benötigt werden, eine Translationsperre aus (Loza-Tavera *et al.*, 2006). Die Phosphorylierungsstelle und die Eigenschaften der für RNP-

Phosphorylierung verantwortlichen Proteinkinase deuten stark auf die CK2 hin (Kanekatsu *et al.*, 1993; Reiland *et al.*, 2009). Auf der einen Seite wurde die CK2 durch Licht aktiviert, auf der anderen Seite phosphoryliert die CK2 auch die  $\beta$ -Untereinheit des ATPase-Komplexes bevorzugt am Ende der Nacht, um möglicherweise die ATP-Hydrolyse während des fehlenden Elektronentransfers zu vermeiden (Kanekatsu *et al.*, 1998; Reiland *et al.*, 2009). Folglich muss die CK2 Spezifität und ihre Aktivität sehr eng reguliert sein, möglicherweise durch spezifische Interaktionen unterschiedlicher CK2 Subpopulationen mit unterschiedlichen Proteinkomplexen (Schoenberg & Bergner *et al.*, 2014). Das Ziel dieser Arbeit ist es die breitgefächerten Rollen der CK2 in der Genregulation und der Signaltransduktion zu verstehen. Die Erweiterung der Kenntnisse der Substrate würde eine enorme Auskunft über das Zusammenspiel der Stoffwechselwege in die die CK2 involviert ist und deren Regulation bzw. Signaltransduktion geben.

## **1.7 Identifikation der Kinasesubstrate**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Substrate der Kinasen zu identifizieren (Venkatesha, 2016). In den letzten Jahren wurden vielfältige Methoden entwickelt um unsere Kenntnisse über die Substrate der Proteinkinasen zu erweitern (Shah und Shokat, 2003; Li *et al.*, 2007; Pimienta *et al.*, 2009). Diese Kenntnisse ermöglichten uns ein genaueres Verständnis einiger Stoffwechselwege. Um das komplette Potential einer Methode auszuschöpfen, muss man sich ihre Vor- aber auch Nachteile bewusst sein, um je nach Anwendung die richtige Methode zu benutzen.

### **1.7.1 Computerbasierte Methode**

Es existieren Algorithmen, die spezifische Sequenzmuster erkennen, so dass bestimmten Proteinkinasen ausgewählte Substrate zugeordnet werden können (Xue *et al.*, 2010). Häufig genutzte Programme zum Vorhersagen der Proteinkinasesubstrate sind: „Kinase Phos 2.0“, „GPS 3.0“, „PhosphoSite“ (Hornbeck *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2008). Wie gut ein Algorithmus die Phosphorylierungsstelle erkennt, hängt von einigen Faktoren ab. Unter anderem davon wieviele Parameter dem Algorithmus vorher zugeordnet wurden. Obwohl die computerbasierte Bestimmung der Substrate ein erster Hinweis sein kann, hat diese Methode Schwachstellen. Die dreidimensionale Struktur der Kinasen und der Substrate wird nicht berücksichtigt. Die Stöchiometrie, die Wechselwirkung zwischen den Substraten und die Lokalisation der Proteine in der Zelle finden in den



computerbasierten Substraterkennungsalgorithmen ebenfalls keine Beachtung. Die wechselnden physiologischen Bedingungen innerhalb der Zelle bleiben ebenfalls ungeachtet. Die computerbasierte Substratfindung weist somit eine sehr starke falschpositive Rate auf.

### **1.7.2 KESTREL (*Kinase Substrate Tracking and Elucidation*) als Methode der Substratsuche**

KESTREL ist eine von Philipp Cohen und Kollegen entwickelte *in-vitro*-Methode mit der die Substrate der Proteinkinasen identifiziert werden können (Cohen und Knebel 2006). Zellysate mit potentiellen Substraten einer speziellen Proteinkinase wurde mit einer gereinigten katalytisch aktiven Proteinkinase unter Zugabe von radioaktiven ATP inkubiert. Die phosphorylierten Proteine werden anschließend entweder angereichert oder direkt mittels SDS-Page (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) visualisiert. Die Komplexität der Probe wird durch die Vorfraktionierung der Zellysate herabgesetzt (Cohen und Knebel 2006). Um das Signal-Rausch Verhältnis zu verbessern wird die Kinase, deren Substrate gesucht werden, in höherer Konzentration eingesetzt und die Reaktionszeit wird sehr kurz gehalten. Obwohl mit dieser neuen Methode viele neue Substrate für einige Kinasen identifiziert werden konnten, ist diese Methode nicht fehlerfrei. Die hohe falschpositive Rate und starke Hintergrundphosphorylierung der Proteine im Zellysate durch endogene Kinasen ist ein Nachteil dieser Methode. Die Versuche, dieses Problem durch Hitzeinaktivierung des Zellysats vor der Zugabe der rekombinanten Kinase und radioaktiven ATP, zu beseitigen waren nur bedingt erfolgreich. Diese Inaktivierung verursachte die teilweise Denaturierung der Proteine, welche die *in-vivo* nicht zugänglichen Seitenketten für diese Proteinkinasen verfügbar machte.

### **1.7.3 Screen des Abbaus der Peptidbibliothek**

Die Identifikation der Kinasesubstrate in großem Maßstab erfolgte mittels Untersuchung des Abbaus der Peptidbibliotheken (Manning und Cantley 2002; Songyang *et al.*, 1994). Bei diesem Ansatz wurde eine Peptidmischung aus Sequenzen variabler Folge um einen unverändert Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest mittels gereinigter rekombinanter Proteinkinase *in-vitro* phosphoryliert. Nach der Anreicherung der phosphorylierten Peptide, werden diese dem Edman-Abbau unterzogen, was zur Identifizierung der Sequenz und somit des Zielpeptids führt. Um nun die potentiellen Substrate zu identifizieren, die dieses Zielpeptid beinhalten,

werden die erhaltenen Daten in einer Selektionsmatrix eingebettet und gegen eine Proteindatenbank nach möglichen Proteinkinasesubstraten durchsucht. Diese Methode ist gut geeignet, um mit anderen Methoden auf der Suche nach neuen Substraten kombiniert zu werden.

#### **1.7.4 Chemisch-genetische Methoden**

Die Struktur der ATP-Bindetasche ist bei allen Proteinkinasen sehr stark konserviert, dies erlaubt das Design von ATP-Analoga, die statt ATP gebunden werden können (Shah und Shokat 2003). Die sterisch anspruchsvolle Aminosäure in der ATP-Bindetasche der Proteinkinase wird durch Alanin oder Glycin ersetzt. Dies führt zur Entstehung einer Kavität in der ATP-Bindetasche. Diese strukturelle Veränderung erlaubt der modifizierten Kinase ATP-Analoga mit einem großen hydrophoben Rest zu erkennen. Zelllysate werden mit der veränderten Proteinkinase und dem markiertem ATP inkubiert. Da die ATP-Analoga durch die Kinasen des Zelllysats nicht für ihre eigene Phosphorylierungsaktivität verwendet werden können, werden diese durch die speziell modifizierte Proteinkinasen für die Übertragung der Phosphatgruppe auf die sich im Zelllysate befindende Substrate genutzt. Die Kombination mehrerer Methoden führt oft zu effizienteren und verlässlicheren Ergebnissen, zum Beispiel die Modifizierung der Proteinkinase so, dass die Hydroxylgruppe des Adenosintriphosphats durch eine radioaktive Thiolgruppe ersetzt wird, wobei die Substrate dieser Kinase im Zelllysate nun radioaktiv thiophosphoryliert werden (Hertz *et al.*, 2010). Das Markieren mit dem Thiophosphat stellt einen so genannten *tag* dar, wobei durch die Affinitätsreinigung die gelabelten Peptide (das Protein wurde vor der Affinitätsreinigung mit Trypsin behandelt) an der Affinitätssäule gebunden werden und andere nicht S-enhaltende Peptide eluiert werden (Bishop *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 1997). Die markierten Peptide werden anschließend durch die *tandem* Massenspektrometrie identifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass dadurch gleichzeitig die Identität der Kinase und die Lokalisation der Phosphorylierungsstelle offenbart werden.

## Einleitung

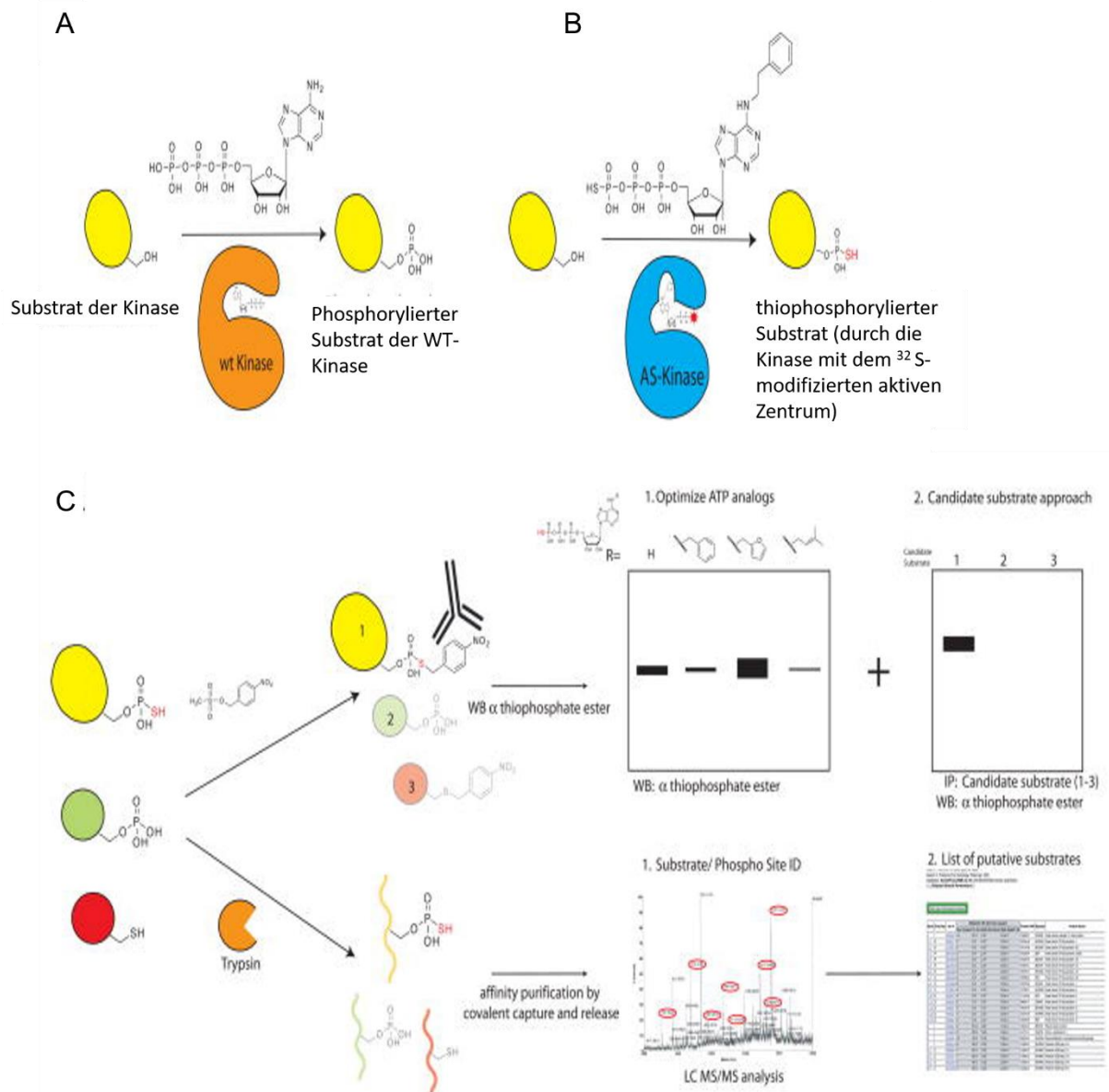


Abbildung 6: Das Prinzip der chemisch-genetischen Methode (Hertz et al., 2010). A, Phosphorylierung durch WT-Kinase. B, Phosphorylierung durch modifizierte Kinase. C Nachweis der generierten Substrate.

Die Abbildung 6 verdeutlicht das Prinzip dieser Methode: Im Teil A ist zu sehen, dass die WT-Kinase das ATP nutzt um ihre Substrate zu phosphorylieren. Im Gegensatz dazu Teil B, wo die Kinase mit modifizierten aktiven Zentrum es es dem sterisch anspruchsvollerem ATP-Analogen erlaubt zu binden, wodurch die Thiophosphogruppe auf das Substrat übertragen werden kann. Im Teil C der Abbildung ist die Beschreibung der beiden unterschiedlichen Affinitätsreinigungsmethoden dargestellt. Die thiophosphorylierten Substrate sind gemischt mit phosphorylierten und nicht markierten Proteinen. Die erste Technik erlaubt es die thiophosphorylierten Proteine mit einem thiol-spezifischen alkylierendem Agens zu verbinden und ein

Thiophosphatester zu generieren. Die markierten Proteine werden mittels Thiophosphatester spezifischen Antikörper detektiert. In der zweiten Variante werden alle thiolhaltigen Peptide durch Reaktion mit Iodacetyl-Agarose-*beads* gebunden. Alle Peptide, die keine Thiolgruppen enthalten werden abgewaschen. Die an der Agarose verbliebenen Peptide werden mit Kaliummonoperoxosulfat ( $\text{KHSO}_5$ ) behandelt, welches durch spontane Hydrolyse die Thiophosphatesterbindung zu der Agarose spaltet. Diese Methode könnte auf die *in-vivo*-Stufe gehoben werden, in dem die Expression der modifizierten Kinase in Zelle angestoßen wird und die Zellen direkt mit ATP-Analoga behandelt werden (Manning und Cantley 2002).

### **1.7.5 Reverse in-Gel Kinase assay (RIKA) als weitere Methode zur Identifikation der Substrate**

Der „Reverse in-Gel Kinase assay“ ist eine weitere Methode zur Identifikation von Substraten der Proteinkinasen. Diese ermöglicht eine direkte Identifikation der Substrate (Li *et al.*, 2007). Die Ko-Polymerisation einer Kinase in einem denaturierenden Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel wird genutzt, um ein Gewebe oder Zellprotein aufzulösen. Die Renaturierung der Kinaseaktivität und der Substratstruktur, gefolgt von der *in-situ*-Phosphorylierung und der massenspektrometrischen Analyse deuten auf ein Substrat der Kinase hin (Li *et al.*, 2007). Zuerst wird die Kinase, deren Substrate gesucht werden auf dem Polyacrylamidgel immobilisiert. Das Zelllysate, aus dem die Substrate identifiziert werden sollen, wird über das Polyacrylamidgel mit der immobilisierten Kinase geschichtet. Über die darauffolgenden Pufferaustauschprozesse können Substrate zu ihrer Kinase finden. Diese Prozesse erlauben es den Proteinen ihre strukturelle Konformation wieder zu gewinnen und der Proteinkinase ihre katalytische Aktivität zurück zu erhalten. Das Gel, welches die immobilisierte Kinase und die Substrate enthält wird dann zusammen mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP in einem Puffer inkubiert, welches den Transfer der Phosphatgruppe begünstigt und somit eine *in-situ*-Phosphorylierung der Substrate durch die Proteinkinase im Gel ermöglicht. Die Position der phosphorylierten Substrate wird durch die Autoradiografie bestimmt, nachdem das unverbrauchte  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ausgewaschen wurde. Die *in-vitro*-Charakterisierung der spezifischen Kinasesubstrate kann über Proteine oder Peptide in einem multi-parallelen *in-vitro*-assay erfolgen. In einem „kinase client assay“ (KiC) wird ein Gemisch aus synthetischen Peptiden genutzt um die Phosphorylierungsaktivität der gereinigten Kinase zu messen. Nach der erfolgten Phosphorylierungsreaktion wurde das

Peptidgemisch mittels Massenspektrometrie analysiert und phosphorylierte Peptide identifiziert und über Spektrenzählung beziehungsweise Messung der Ionenintensität quantifiziert. Die Überprüfung dieser Methode unter der Verwendung einer Mischung aus 79 Peptiden (11-20mere) und gereinigter Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) ergab eine hohe Spezifität für dieses assay System (Huang *et al.*, 2010).

### **1.7.6 Peptidchip**

Eine ähnliche Versuchsanordnung wie oben beschrieben stellen die „Peptidchips“ dar. Dabei werden Peptide als feste Phase auf einen Objektträger oder einer Membran immobilisiert. Mit diesem Aufbau kann die Phosphorylierungsaktivität gereinigter Kinasen oder Pflanzenlysate *in vitro* getestet werden (Thiele *et al.*, 2010). Der Vorteil des „Peptidchip“ ist seine hohe Dichte an Peptiden, die als potentielle Substrate immobilisiert werden können (mehr als 1000 auf einem Chip). Diese Versuchsanordnung hat jedoch auch ihre Nachteile, in Form von unspezifischen Oberflächeneffekten auf die Kinaseaktivität, die durch Peptidimmobilisierung und den Freiraum zwischen der Zielaminosäure und fester Phase bedingt sind. Da der Chip eine der verwendeten Methoden darstellt, ist die detaillierte Beschreibung im Kapitel 3.10 zu finden.

### **1.7.7 Die Identifikation der Kinasesubstrate mit Protein arrays**

Mit „protein arrays“ kann die Kinaseaktivität mit einigen Substraten parallel *in-vitro*, sowohl in Lösung oder auf einer Membran immobilisiert, bestimmt werden. Diese Anordnung repräsentiert den so genannten Standard-Kinase-assay mit ausgewählten Substraten, in dem der Transfer radioaktiven Phosphats von  $\gamma$ -<sup>32/33</sup>P-ATP oder GTP auf die Zielproteine gemessen und quantifiziert wird. Protein arrays sind für *Arabidopsis thaliana* verfügbar und werden verwendet um die Substrate der *mitogen activated protein*-Kinasen zu identifizieren (Feilner *et al.*, 2005; Popescu *et al.*, 2009).

### **1.7.8 SILAC steht für „stable isotope labeling by amino acids in cell culture“**

Bei diesem Verfahren werden den Nährmedien mit schweren Isotopen markierte Aminosäuren zugesetzt. In der Regel erfolgt die Markierung in Zellkulturen, es lassen sich aber auch die Proteine ganzer Organismen wie *Mus musculus* oder *Drosophila melanogaster* markieren (Ong *et al.*, 2002). Meistens werden Lysin und/oder Arginin für die Markierung eingesetzt und die untersuchten Proteine vor der Analyse mit Trypsin verdaut, so dass eine Quantifizierung auf der Ebene von Peptidsignalen im

Massenspektrum erfolgt. Peptide, die mit „schweren Aminosäuren“ markiert waren unterscheiden sich in ihrer Isotopenzusammensetzung, verhalten sich aber während der Probenpräparation, Auftrennung und Analyse wie die nativen Aminosäuren. Die relativen Verhältnisse der Peptidsignale im Massenspektrum korrelieren direkt mit dem Verhältnis der zu vergleichenden Peptide aus der Probe. Mit geeigneter Software lassen sich die relevanten Signale extrahieren und Peptidverhältnisse errechnen. Durch Verwendung verschiedener Isotope lassen sich in einem LC-MS-Lauf mehrere Proben analysieren. Isotopenmarkierte Peptide lassen sich in einem „*spike-in*“-Standard verwenden und können gemeinsam mit unmarkierten Proben gemessen werden. Dieser Ansatz findet Verwendung, wenn Organismen oder anderes Probenmaterial nicht direkt markiert werden kann (z.B. zu geringer Anteil in der Probe). Durch den relativen Bezug zum Standard ist der quantitative Vergleich von mehreren unmarkierten Proben untereinander möglich (Ong *et al.*, 2002; Pimienta *et al.*, 2009). Diese neuen und sich bewährte Methoden werden auch kombiniert eingesetzt und verbessert, um eine möglichst hohe Anzahl korrekter Substrate der vielen Proteinkinasen zu finden (Christofk *et al.*, 2011).

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen der Promotion sollten homozygote *ck2*-Pflanzen selektiert, sowie eine phänotypische und molekularbiologische Charakterisierung erfolgen. Es sollte geklärt werden, ob es sich bei der verwendeten mutanten *ck2*- Linie (GK615F11) um ein *knock-out*- oder eine *knock-down*- Mutation handelt und in wie fern die Genexpression der plastidären CK2 vom Alter der Pflanze abhängig ist. Zur Vervollständigung der Charakterisierung sollte die Mutation komplementiert werden. Gleichzeitig sollte die Komplementationslinie so konstruiert werden, dass die Interaktionspartner der CK2 über ein geeignetes System isoliert und bestimmt werden können.

Die Casein Kinase 2 phosphoryliert auch möglicherweise Thylakoidmembranproteine, was den Einfluß der CK2 auf die Lichtreaktion der Photosynthese zeigen würde. Die phosphorylierten Enzyme des Calvin Zyklus (Schonberg & Bergner *et al.*, 2014), (Kim *et al.*, 2016), sprechen für die Regulation der Dunkelreaktion. Damit schien eine kombinierte Analyse der Metabolite der Dunkelreaktion mit ungerichteter und gerichteter Phosphoproteomeanalyse hilfreich, um die Regulation der Kinase in Bezug auf die Photosynthese zu verstehen und ihre Interaktionspartner zu bestimmen. Eine zusätzliche Untersuchung des Phosphoproteomes der Wurzel der *ck2*-Linie sollte Einblick in die Signalschaltung zwischen Rosette und Wurzel geben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 *Arabidopsis thaliana*

Für die gesamten Experimente wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col 0), sowie die ursprünglich heterozygote Linie GK615F11 mit dem genetischen Hintergrund Col 0 verwendet. Diese stammen aus dem Saatgut des *Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC)*. Die mit der rekombinanten CK2 komplementierte Linie GK615F11(TAP-CK2) wurde im Rahmen dieser Arbeit selbst erzeugt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte je nach durchgeführten Experiment unterschiedlich.

##### 3.1.1 Anzucht auf Erde

Die Anzucht auf Erde erfolgte für quantitative RT-PCR- (*real time polymerase chain reaction*) und *metabolomics*-Experimente. Dazu wurde ein Sand-Samen-Gemisch (zur besseren Verteilung des Saatguts) gleichmäßig auf feuchter vorher autoklavierter Erde ausgebracht und zunächst für 2-3 Tage im Kühlraum stratifiziert und anschließend im Phytoschrank (CLF Plant Climatic GmbH Modell CU-36L3) unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 24 °C, 16h Dunkelheit bei 20°C) angezogen. Die Stratifikation wird durchgeführt um die Samenruhe zu simulieren und zu erreichen, dass möglichst alle Samen vor ihrer Keimung dieselbe Behandlung erfahren.

##### 3.1.2 Anzucht auf Platte

Die Anzucht unter sterilen Bedingungen erfolgte für alle weiteren Experimente mit vorher sterilisierten Samen. Dazu wurden die Samen von *Arabidopsis thaliana* Linien für 3 min in 70% (v/v) Ethanol und für weitere 5 min in 5% (v/v) Natriumhypochlorit sterilisiert. Nach fünfmal Waschen mit sterilem Wasser wurde das Saatgut in 0,1% (v/v) sterilem Agar aufgenommen und zunächst für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert. Dann wurde das stratifizierte Saatgut auf  $\frac{1}{2}$  -*Murashige-Skoog*-Medium (Firma Duchefa) ( $\frac{1}{2}$  MS) (0,22 % (w/v) MS inklusive Vitamine, 0,8 % (w/v) Saccharose, 1 mM MES Monohydrat). Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 5,6 mit KOH wurde 0,8 % (w/v) Pflanzenagar hinzu gegeben in quadratischen Petrischalen (10 cm x10 cm) ausplattiert. Die Petri-Schalen mit Samen wurden anschließend im Phytoschrank (AR-41L3 und AR-66/L3) unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 24 °C, 16h Dunkelheit bei 20°C) angezogen.



### 3.1.3 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte je nach dem durchgeführten Experiment auf unterschiedliche Weise. Für die Chloroplastenisolation und alle damit verbundenen Experimente wurden die Platten mit den Pflanzen zeitnah nach dem Einschalten der Belichtung aus dem Schrank genommen und am Platz die Ernte durchgeführt (41). Für die *metabolomics*-Experimente erfolgte die Probenentnahme 2 h nach dem Einschalten der Belichtung. Hierzu wurden jeweils der grüne Teil der Pflanze in 50 ml Greiner-Röhrchen innerhalb von 2 s in Stickstoff überführt und blieben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

## 3.2 Bakterien

Für die Anzucht und Überexpression der rekombinanten CK2 wurden die Stämme BL 21 DE3 *E. coli* (Genotyp *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::(lac::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*) beziehungsweise TB1 *E. coli* (Genotyp F<sup>-</sup> *ara Δ(lac-proAB) [Φ80dlac Δ(lacZ)M15] rpsL(Str<sup>R</sup>) thi hsdR*) genutzt. Die Bakterien wurden im LB-Medium: 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 L pH 7,0) gezüchtet. Für die Klonierungen wurden DH5α *E. coli* (Genotyp *deoR, endA1, gyrA96, usdR17 (rk – mk+), recA1, supA1, supE44, thi-1, Δ (lacZYA argFV169), Φ80lacZ ΔM15, F*) Zellen benutzt. Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* fanden *Agrobacterium tumefaciens* ihre Verwendung.

### 3.2.1 Anzucht von Zellen von *Escherichia coli*

Auf dem Luria-Bertani (LB)-Medium mit Agar wurde ein Verdünnungsausstrich aus der Glycerollösung des Bakteriums gemacht, um Einzelkolonien der Bakterien zu erhalten. Anschließend wurden 6 Glasröhrchen mit je 2 ml Kultur mit einer Kolonie geimpft und bei 37°C über Nacht und unter leichtem Schütteln wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die üN-Kultur in sechs 2-L-Erlenmeyerkolben überführt und regelmäßig die optische Dichte bei 595 nm gemessen. Nach dem Erreichen der optischen Dichte von 0,5-0,8 erfolgte die Induktion mit 0,3 mM IPTG. Anschließend wurden die Zellen für 3 h bei 250 rpm bei Raumtemperatur inkubiert und bei 3000 xg herunterzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde bei -20°C bis zur seiner Verwendung gelagert.

### 3.2.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Auf dem YEP- Medium mit Agar wurde ein Verdünnungsausstrich aus der Glycerollösung des Bakteriums angesetzt, um Einzelkolonien der Bakterien zu erhalten. Die Anzucht der *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen erfolgte in YEP-Medium

(10 g Hefeextrakt, 10 g Bactopepton, 5 g NaCl, ad 1 L pH 7) mit Rifamicin, Gentamycin und Kanamycin mit Konzentrationen von je 50 µg\*ml<sup>-1</sup> bei 28°C über Nacht. Mit einer 2-ml-Übernachtskultur wird eine 400 ml Kultur angeimpft und nochmals über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur 15 min bei 1400g und RT abzentrifugiert und das Pellet bis zur seiner Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### 3.3 Plasmide und Vektoren

#### 3.3.1 Plasmid pMALc5x (Amp<sup>+</sup>)

Für die Überexpression der rekombinanten CK2 wurde pMALc5x (Amp<sup>+</sup>) verwendet.

Created with SnapGene®

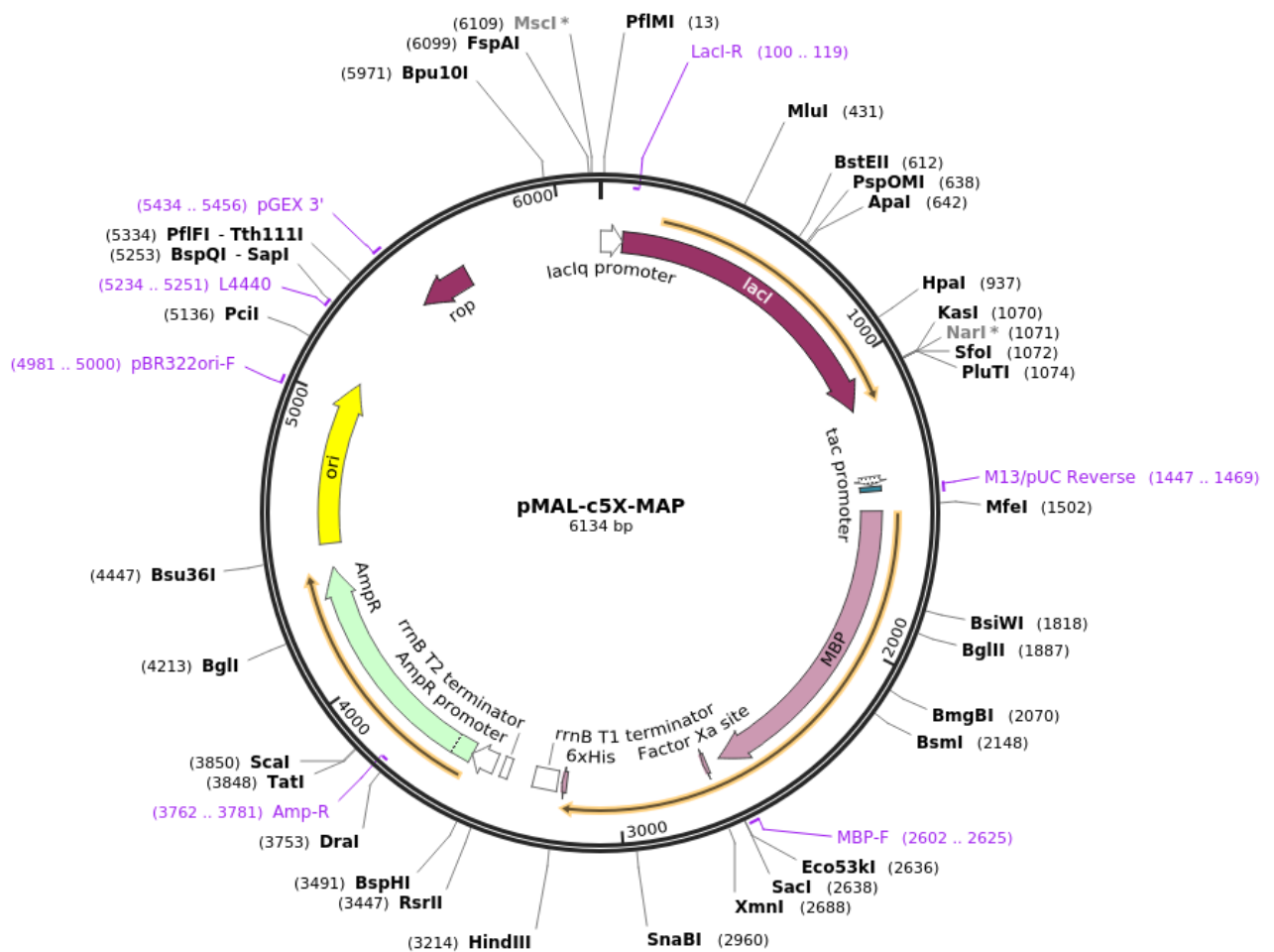


Abbildung 7: Vektorkarte des pMALc5x-Plasmids. (Copyright: Addgene)

Der Vektor pMALc5x (New England BioLabs) ist ein 6134 bp großes Plasmid (Abbildung 7) und wurde entwickelt, um eine cytoplasmatisch exprimierte Fusion des Zielproteins mit dem maltosebindenden Protein (MBP) zu ermöglichen. Das Zielprotein wurde am Ende des Reinigungsprozesses mittels Amylose-Affinitätschromatographie durch die spezifische Protease Faktor Xa von dem maltosebindenden Protein getrennt.

Als Selektionsmarker besitzt der pMALc5x Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Das Gen der CK2 wurde in die Restriktionsschnittstelle des Polylinkers in dieselbe translationale Leserichtung wie das *malE*-Gen (kodiert das Maltosebindendeprotein) eingefügt. Die Sequenz Ile-Glu-Gly-Arg ist nur ein Mal *upstream* von der *XmnI*-site vorhanden und wurde an dieser Stelle durch die spezifische Protease Faktor Xa von Maltosebindendenprotein getrennt und hat am Ende des Reinigungsprozesses theoretisch keine vektorspezifischen Sequenzen am Zielprotein.

### 3.3.2 Plasmid pDONR223 (Spec<sup>+</sup>)

Für die *Gateway*-Klonierung wurde der Donorvektor pDONR223 (Spec<sup>+</sup>) verwendet.

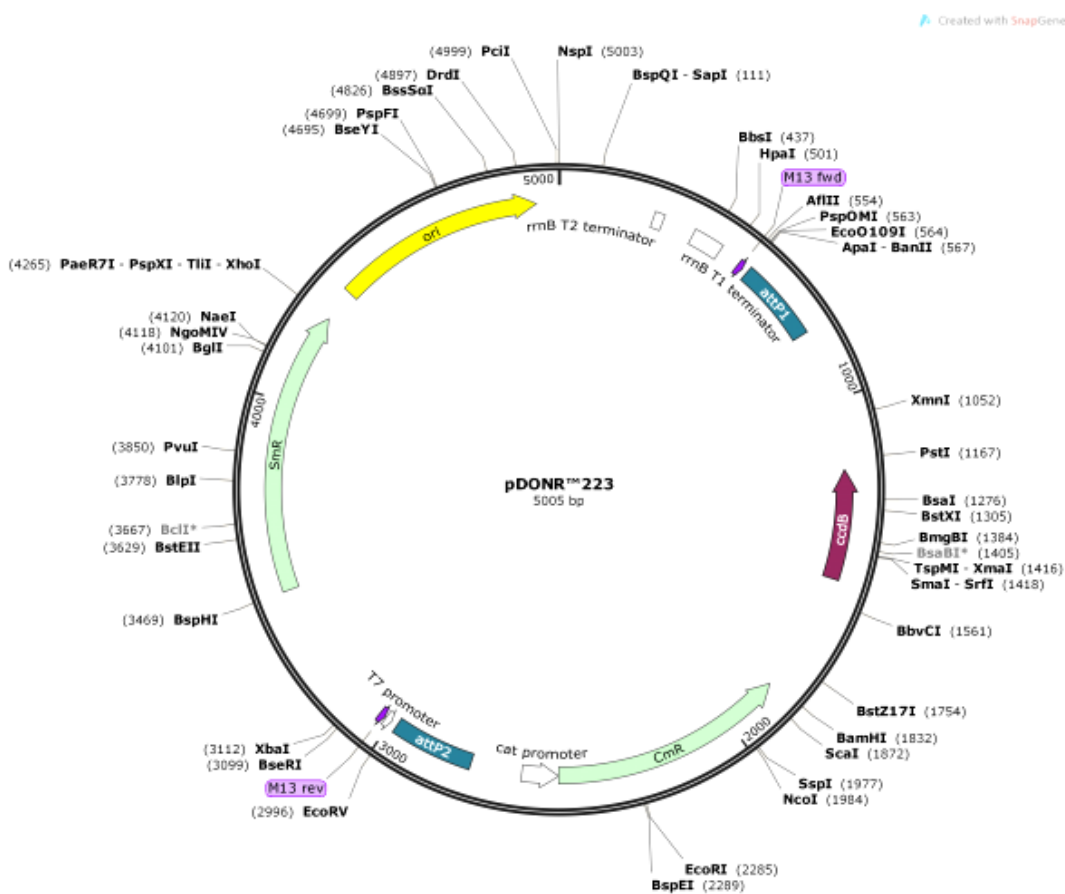


Abbildung 8: Vektorkarte des pDONR 223-Vektors. (Copyright: Addgene)

In dem 5005 bp großen *entry vector* pDONR223 flankieren der universelle Forwärts- (M 13 fwd) und Rückwärtssequenzierungsprimer (M13rev) die Rekombinationsstellen attP1 and attP2 (Abbildung 8). Der Spektinomycinresistenzgen ermöglicht eine spezifische Selektion und den Einsatz eines Ampicillinresistenzmarkers im Zielvektor.

### 3.3.3 Plasmid pEarleyGate205

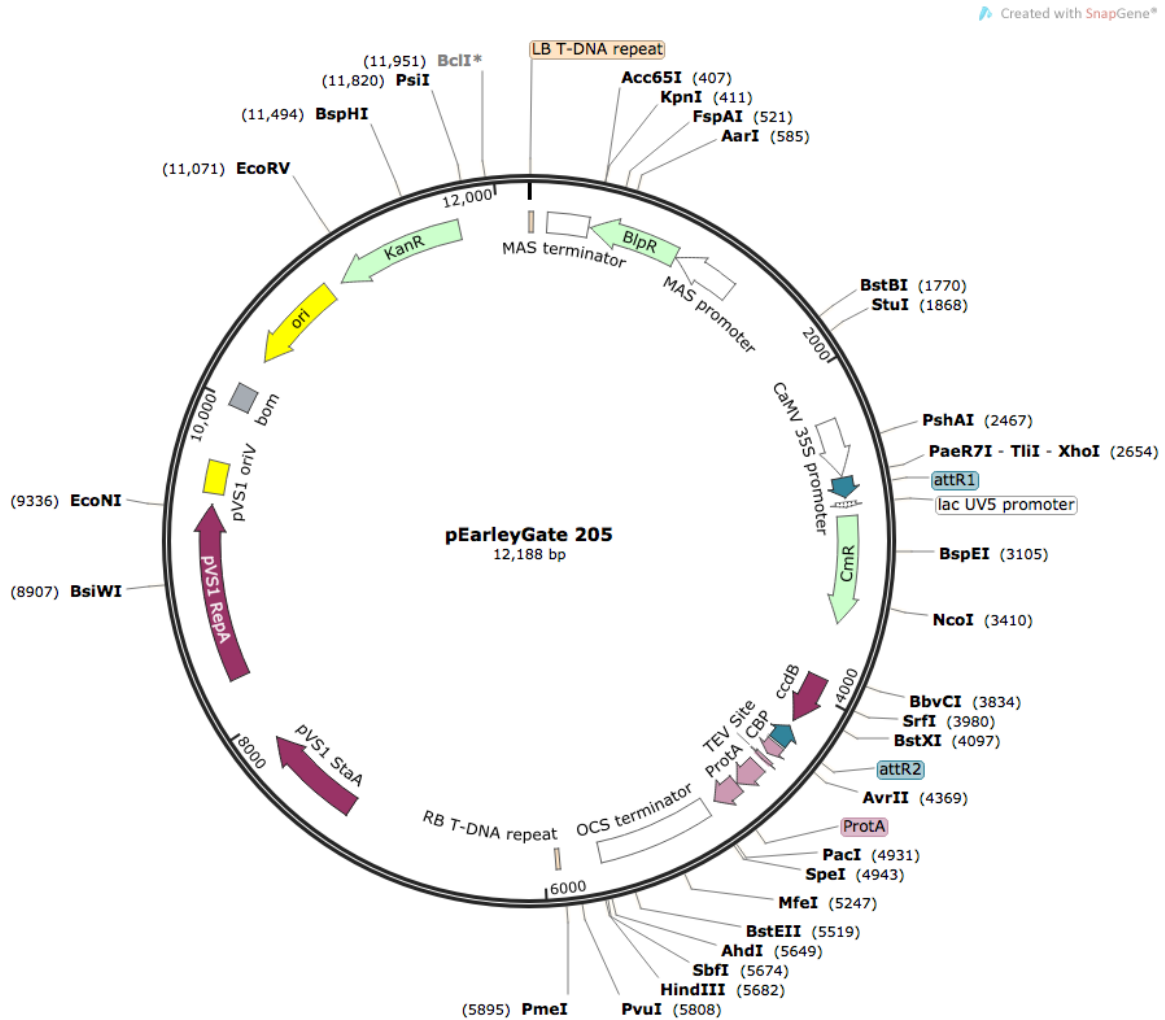


Abbildung 9: Zielvektor für die Herstellung der komplementierten Linie GK615F11. (Copyright: Addgene)

Der 12188 bp große pEarleyGate 205 Vektor (Abbildung 9) erlaubt das Anfügen eines TAP (*tandem affinity peptide*)-Epitops an das Zielprotein. Dieser Vektor nutzt den 35 S Promotor, um eine starke konstitutive Expression des modifizierten Proteins zu gewährleisten. Außerdem erlaubt die Kanamycinresistenz eine einfache Selektion positiver Klone.

### 3.4 Primer

Tabelle 1: Für die Klonierungen verwendeten Primer in 5'-->3' Ausrichtung. T: Annealingtemperatur

Primername	Primersequenz	T, in °C	Verwendung
FW_attB1_CK2	GGG GAC AAG TTT DTA CAA AAA AGC AGG CTC AAC AAT GGC CTT AAG GCC TTG TAC	52	Gateway-Klonierung der rekombinanten CK2 mit Transitpeptid
RV_attB2_CK2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTG GCT GCG CGG CGT ACG GC		
FW_NotI	GTA TAG CGG CCG CGC TTC TCT TTA CCG TCA AC	72	Klonierung der CK2 ohne Transitpeptid in den Vektor pMALc5x(Amp+)
RV_BamHI	GTA TAG GAT CCT CAC TGG CTG CGC GGC G		
FW_qRT-PCR-At2g23070	GTCCGTGTTGCTTCAAGGTA	55	qPCR, quantitative Bestimmung der Expressionsmenge an plastidärer CK2
RV_qRT-PCR-At2g23070	CCAGCAAACATACACCCAAG		
FW_qRT-PCR_At2g23080	TGGAGTCTTGGTTGCATGTT	55	qPCR, quantitative Bestimmung der Expressionsmenge an cytosolischer CK2
RV_qRT-PCR_At2g23080	ACTCATTGGTTCCCAACACC		
FW_CK2	TTCCACCGAAAATTTATCAAAA AG	64	Genomische PCR, Homozygotie-Test
RV_CK2	TCGCAATCTTCTCTTTGATCG		
FW_WT	TTCCACCGAAAATTTATCAAAA AG	55	Genomische PCR, zum Homozygotie-Test
RV_WT	ATATTGACCATCATACTCATT GC		

### 3.5 Antikörper

Tabelle 2: in dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Rabbit anti-RCA (pT78)	1:4000	Agrisera
Prä-Immuns serum	1:2000	AG Köck
Rabbit IgG ICN	1:2000	Agrisera
Anti CBP	1:2000	Agrisera
Anti cpCK2	1:1000	Agrisera

Als sekundärer Antikörper wurde ausschließlich *goat-anti-Rabbit IgG HRP (horse radish peroxidase conjugated)* der Firma Agrisera mit einer Verdünnung 1:10000 verwendet.

### 3.6 Molekularbiologische Methoden

Alle nicht gesondert aufgeführten Methoden wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien bei den Firmen Roth oder Sigma Aldrich bestellt. Bei allen Experimenten wurden immer drei unabhängige biologische Replikate vermessen bzw. untersucht. Jedes biologische Replikat seinerseits wurde ebenfalls drei Mal vermessen, es wurden also zusätzlich 3 technische Replikate angefertigt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Dr. Gerd Hause durchgeführt.

#### 3.6.1 DNA Extraktion aus Blättern

Ein kleines Blatt wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 300 µl *shorty*-Puffer (0,2 M Tris /HCl pH 9; 0,4 M LiCl; 25 mM EDTA) versetzt. Anschließend folgt eine 5-minütige Zentrifugation mit 16 000 xg bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Anschließend wurde wieder mit 16 000 xg bei 4 °C 45 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet (*SpeedVac*) und in 30 µl sterilem Wasser aufgenommen.

### 3.6.2 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Zunächst wurde eine PCR mit Primern so durchgeführt, dass das entstandene PCR-Produkt die im Vektor vorhandenen Restriktionsschnittstellen NotI und BamHI enthält. Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA eingesetzt (Mullis und Faloona 1987). Eine Standard-PCR-Reaktion enthielt in einem Gesamtvolumen von 25 µl die Komponenten in der Tabelle 3 aufgeführt. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach dem in Tabelle 4 zusammen gefasstem Programm.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes. FW Primer =Vorwärtsprimer, RW=Rückwärtsprimer.

Komponente	Volumen, µl
DNA	1µ
jeweiliger Puffer	2,75
dNTPs (2,5 mM)	1
FW Primer (20 µM)	0,5
RW Primer (20 µM)	0,5
Pfu-Polymerase	0,25 (1 U)
H <sub>2</sub> O	19

Tabelle 4: verwendetes PCR-Programm

Schritt	Dauer, min	Temperatur, °C	Anzahl Zyklen
Denaturierung	2	95	1
	0,5	95	
Annealing	0,5	primerabhängig	32
Elongation	1,3	72	1
	10	72	
Kühlung	∞	4	Ende

### 3.6.3 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Um den mRNA-Gehalt aus unterschiedlichen Pflanzen zu vergleichen, wurde zunächst die RNA in Erststrang-cDNA umgeschrieben und dann eine *real-time* PCR mit der Erststrang-cDNA und genspezifischen Primern durchgeführt. Die Primer sind im *Tabelle 1* aufgeführt.

In der *real-time* PCR, die wie eine normale PCR (3.6.2) funktioniert, wurde zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (BioRad) zugesetzt. Dieser Farbstoff gibt bei

der Bindung an doppelsträngige DNA ein Signal, welches proportional zur DNA-Menge ist. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei  $\lambda_{497 \text{ nm}}$  und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{520 \text{ nm}}$ . Durch die Fluoreszenzmessung am Ende eines jeden Zyklus ist eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge möglich. Hier soll der relative Gehalt eines Gens untersucht werden. Daher wurde die Zyklenzahl ( $C = \text{cycle}$ ), bei der das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert ( $T = \text{threshold}$ ) überschreitet bestimmt. Er wird als CT-Wert bezeichnet. Anhand des CT-Wertes lässt sich der relative Gehalt eines Gens in Pflanze nach der  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001) berechnen. Zunächst wurde der CT-Wert des Zielgens durch Subtraktion des Referenzgens (Actin) normalisiert ( $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$ ). Vom  $\Delta\text{CT}$ -Wert der Pflanze wurde der T-Wert der Kontrollpflanze subtrahiert. Jetzt erhält man den  $\Delta\text{CT}$ -Wert, der der Zyklendifferenz zwischen den beiden Pflanzen entspricht. Unter der Annahme, dass mit jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wurde, lässt sich der relative Expressionsunterschied als n-fache Menge der Kontrollpflanze mit der Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  berechnen.

Die *real-time* PCR wurde mit dem Bio-Rad iCycler und dem iCycler™iQ Optical System Software Version 3.0a von Bio-Rad durchgeführt.

Um die Genauigkeit der PCR zu verifizieren, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, da SYBR-Green an jede doppelsträngige DNA bindet und so mögliche unspezifische Produkte wie Primerdimere detektiert werden können. Weiterhin wurde die falsch-positive Messung der Primerdimere durch eine Fluoreszenzmessung bei 72°C ausgeschlossen.

In der Tabelle 5 sind die einzelnen Schritte des verwendeten Programms abgebildet.

Tabelle 5: das verwendete qPCR-Programm

Schritt	Dauer, min	Temperatur, ° C	Anzahl Zyklen
Denaturierung	3 min	95,0	1X
	0,3	95,0	40X
Annealing	0,3	60,0	
Elongation	0,3	72,0	
	1	95,0	1
	1	55,0	
	0,15	55,0	80
erhöhe die gesetzte Temperatur nach jedem Zyklus um 0,5°C			
Kühlung	∞	4→	Ende



### 3.6.4 Quantitative *real-time*-PCR-Effizienzanalyse

Die Effizienz einer PCR-Reaktion kann mit unterschiedlichen Methoden errechnet werden (Liu und Saint 2002, Livak und Schmittgen 2001). Meine Methode der Wahl war das Erstellen einer Standardkurve (Pfaffl 2004). Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus allen verwendeten experimentellen cDNA-Proben erstellt. Die eingesetzte Menge an cDNA (mRNA) wurde in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dem CP dargestellt. Die Effizienz berechnete sich nach der Formel:

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Anstieg}}}$$

Eine optimale Effizienz von 2 ergibt sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird.

### 3.6.5 Prinzip des *tandem affinity peptide-tags* (TAP-tag)

Der Tap-tag besteht aus einem Peptid des Calmodulin-bindenden Proteins, 2-mal das Proteins A, welches an die Immunglobulin G (IgG)-Bindestelle andockt, getrennt durch eine TEV-Protease Spaltstelle (Rigaut *et al.*, 1999). Dieser Gateway-Vektor benutzt den CamV-35SS-Promotor, um die Expression auszulösen. Über die IgG Bindestelle des Donorvektors können mithilfe der IgG-beads alle mit dem am TAP-Vektor assoziierte Interaktionspartner effizient gereinigt werden (Andrès *et al.*, 2011).

### 3.6.6 Gateway-Klonierung

Die Gateway-Klonierungsstrategie basiert auf dem spezifischen *in-vivo*-Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$ , bei dem dieser seine DNA in das Chromosom von *Escherichia coli* integriert. Beide Organismen besitzen spezifische Rekombinationsseiten genannt *attP* im Phage  $\lambda$  und *attB* in *Escherichia coli*. Der Integrationsprozess (Lysogenie) wird durch zwei Enzyme katalysiert: Im Phagen kodierte Integrase (Int) und *E.coli* Protein IHF (*Integration Host Factor*). Während der Integration werden durch die Rekombination zwischen *attB* und *attP* neue *attL* und *attR* generiert, die die DNA des Phagen  $\lambda$  flankieren.

Dieser Prozess ist reversibel und die Rückreaktion wird ebenfalls von Int und IHF katalysiert, mit der Beteiligung des Proteins Xis aus dem Phagen  $\lambda$ . Die *attL*- und *attR*-Stellen, die die eingeführte Phagen-DNA flankieren, rekombinieren seitenspezifisch und führen zur Rekombination der *attP*-Stelle im Phagen  $\lambda$  und der *attB*-Stelle im Chromosom von *Escherichia coli*.

Ziel der Gateway-Klonierung ist es einen Expressionsklon zu erhalten.

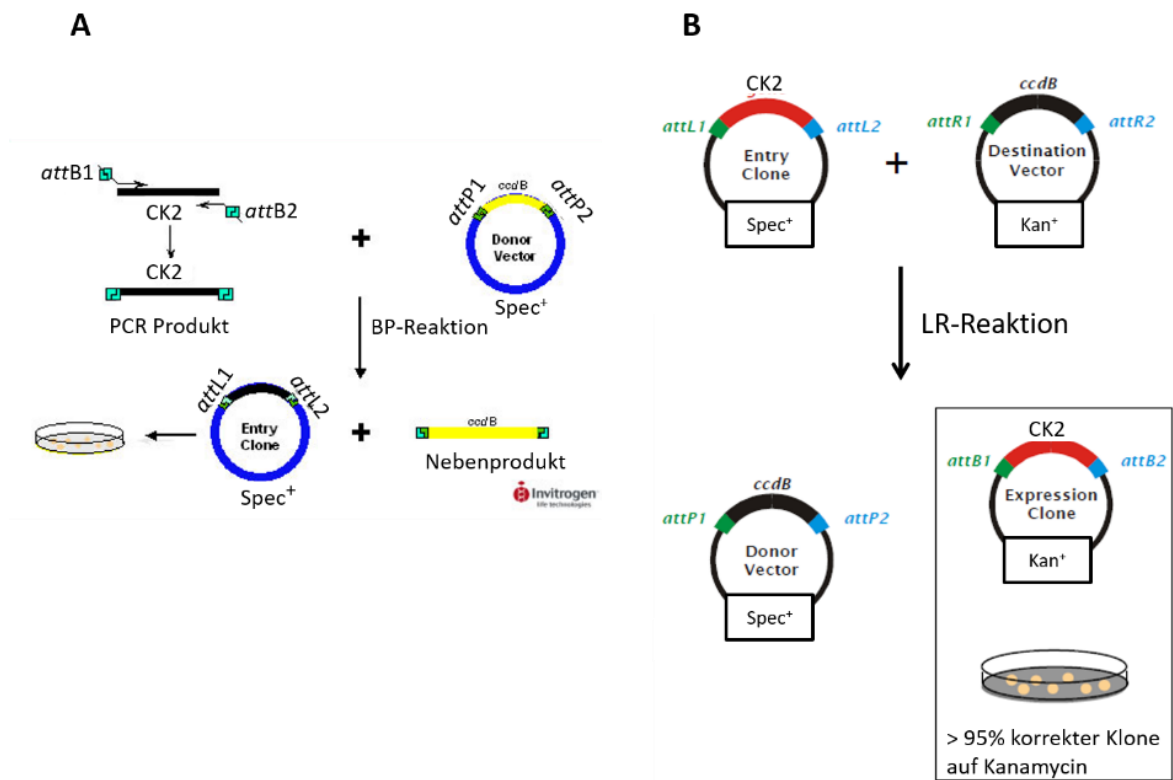


Abbildung 10: Übersichtsdarstellung der A: BP- und B: LR-Reaktionen der Gateway Klonierung. Bearbeitete Grafik der Firma Invitrogen.

Die Gateway-Reaktionen *in-vitro* basieren auf demselben Prinzip, welches etwas abgewandelt wurde. In der BP Reaktion reagiert *attB1* nur mit *attP1*, *attB2* nur mit *attP2*. Als Ergebnis der Rekombination entstehen *attL1* und *attR1*, *attL2* und *attR2* (s. Abbildung 10 A). Nach der Klonierung der *CK2* in den *entry vector* (pDONR223+) ist dieser durch *attL1* und *attL2* flankiert. Der *entry vector* ist transkriptionell inaktiv und enthält das Gen für die Spektinomycinresistenz. Um den Expressionsklon zu erhalten, muss die *CK2* in den Zielvektor umklontiert werden. Dieser Zielvektor (pEarleyGate205) enthält alle wichtigen Sequenzinformationen für die Expression, Kanamycinresistenz und die zwei Rekombinationsstellen (*attR1* und *attR2*), die das Gen für die Negativselektion flankieren (*ccdB* kodiert toxisches Protein im Standardstamm von *Escherichia coli*). Die beiden Plasmide (pEarleyGate205 und pDONR223+) mit der einklonierten *CK2* werden gemischt und LR-Clonase-Enzym-Mix wird hinzugegeben. Die Rekombinantsausbeute sind zwei Konstrukte Expressionsklon und das Nebenprodukt. Der entstandene Expressionsklon hat nun zwei verschiedene Selektionsmarker, die Antibiotikaresistenz und die Negativselektion

durch das toxische *ccdB*-Protein. Nach der Transformation in die Standardexpressionsstämme DH5 $\alpha$  beziehungsweise BL21 (DE3) entstanden > 99% positiver Klone heraus (Abbildung 10 B). Die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten der *Gateway*-Klonierung erfolgte strikt nach dem Protokoll von Thermo Fischer Scientific.

### **3.6.7 Transformation**

Unter Transformation versteht man in der Molekularbiologie die Übertragung freier rekombinanter DNA in eine kompetente Bakterienzelle. Da *Escherichia coli* die natürliche Kompetenz zur Aufnahme von freier DNA fehlt, müssen die Zellen dazu vorbereitet, kompetent gemacht, werden.

#### **3.6.7.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen von *Escherichia coli*.**

Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt aus 5 ml LB-Medium, die mit einer Kolonie der Zellen von *Escherichia coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurde in 1 L Kolben mit 250 ml autoklaviertes Medium A (2 % (w/v) Bacto-Tryptone, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) befüllt und die Vorkultur hinzugegeben. Bei 20 °C werden die Zellen bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-07 inkubiert. Nach 10 min bei 4 °C Ruhezeit und anschließender Zentrifugation mit 2500 xg bei 4 °C 5 min wird das Bakterienpellet in 40 ml eiskaltem sterilem TB-Medium (10 mM PIPES/ KOH, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,7) resuspendiert und nach Zugabe von 1,4 ml DMSO in 200  $\mu$ l Aliquots in flüssigen Stickstoff bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **3.6.7.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*- Zellen**

Die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Ein 200  $\mu$ l Aliquot chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ - oder TB1-*E.coli*-Zellen wird für 10 min auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde 1  $\mu$ l Ligationsansatz oder Plasmid-DNA hinzu pipettiert und nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 2 min wird der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin werden 800  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend 3 min bei 5000 xg zentrifugiert und 900  $\mu$ l des Überstandes verworfen. Das Pellet wurde in den übrigen 100  $\mu$ l Überstand wieder resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert.

### 3.6.7.3 Transformation von *Agrobacterien tumefaciens*

Ein Aliquot der Zellen von *Agrobacterien tumefaciens* wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und danach 5 min auf 37 °C erwärmt. Nach der Zugabe von 1 ml YEP-Medium wurde das Bakterien/Plasmidgemisch 4 h bei 28°C mit 150 rpm geschüttelt und danach auf LB-Agarplatten mit 3 Antibiotika (je 50 µg\*ml<sup>-1</sup>Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin) ausplattiert. Das Wachstum der Bakterienkolonien erfolgte für 2 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur.

### 3.6.7.4 Floral Dip

Für den sich anschließenden *floral dip* wurden blühende Pflanzen verwendet. Der Zeitpunkt wurde so gewählt, dass nur wenig Schoten angelegt waren. Die bereits angelegten Schoten wurden abgeschnitten. Das eingefrorene Pellet von *Agrobakterium tumefaciens* wurde im Transformationsmedium (5 % (w/v) Saccharoselösung; 0,05 % (v/v) Sufarkant Silwet L - 77) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 inkubiert. Die Blütenstände wurden mehrmals kurz hintereinander in diese Suspension für ca. 30 s getaucht. Kurze Blütenstände, die nicht in die Suspension eingetaucht wurden, konnten mit einer Pipette betropft werden. Die Pflanzen wurden anschließend zur Regeneration zunächst horizontal bei hoher Luftfeuchtigkeit in ein Gewächshaus gelegt und nach einer Nacht wiederaufgerichtet. Die sich nun bildenden Schoten enthalten im Idealfall unser gewünschtes Plasmid (Clough und Bent 1998).

## 3.7 Proteinchemische Methoden

### 3.7.1 Standardmethoden

#### 3.7.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

In der Regel erfolgten die Bestimmungen der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (1976). Zu 790 µl Wasser werden 200 µl Bradfordreagenz (Roti Quant) und 10 µl einer Probe pipettiert und die maximale Absorption, die nach 3 min bei 595 nm erreicht wurde, mittels Photometer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit den Zahlen der jeweiligen Eichgerade folgendermaßen errechnet:

$$c \left( \frac{mg}{ml} \right) = \frac{A_{595 \text{ nm}} - 0,022}{0,414} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.7.1.2 Chlorophyllbestimmung der Pflanzenproben

Zunächst wurde die Pflanzenprobe im 80% Aceton gelöst und 3 min bei 10000 xg zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 652 nm. Die Chlorophyllmenge berechnet sich nach folgender Formel:

$$c \left( \text{Chlorophyll in } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{OD_{652 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{36 \text{ (Extinktionskoeffizient)}}$$

### 3.7.1.3 Chloroform/ Methanol-Fällung von Proteinen

Die Chloroform/Methanol-Fällung wurde entsprechend Tabelle 6 durchgeführt. Das Proteinpellet wurde anschließend in dem Konzentrator getrocknet.

Tabelle 6: Übersicht der Arbeitsschritte bei der Chloroform/Methanol-Fällung

Bestandteil	Volumen, µl
Probe	100
Chloroform	240
Methanol	80
kurz durchmischen	
dest. Wasser	320
1 min bei 10000 xg zentrifugieren, Überstand verwerfen.	
Methanol	320
5 min bei 10000 xg zentrifugieren, Überstand verwerfen.	

### 3.7.1.4 Aceton-Ethanol-Fällung der Proteine

Die extrahierten Proteine wurden mit eiskaltem Aceton (Endkonzentration 80 % (v/v)) und eiskaltem Ethanol (Endkonzentration 10% (v/v)) versetzt und über Nacht bei -80°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (16 000 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet 2-mal gewaschen (80 % (v/v) Aceton, 10 % (v/v) Ethanol) und jeweils zentrifugiert.

### 3.7.2 Chloroplastenisolation

Die Chloroplastenisolation wurde entweder mit dem enzymatischen Aufschluß nach Fitzpatrick und Keegstra (2001) oder einem mechanischen nach Kubis *et al.*, (2008) durchgeführt. Alle Experimente wurden mit 14 Tage alten Pflanzen durchgeführt. Die Lagerung der Chloroplastenpellets erfolgte bei -80°C. Die Isolation der Chloroplasten erfolgte immer aus der Dunkelphase heraus entnommen.

### 3.7.3 Herstellung von Pflanzenlysat

Dazu wurden vier zwei Wochen alte Pflänzchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann mit 400 µl Rensink (100 mM NaCl; 50 mM TrisHCl pH 7,5; 0,5% (v/v) Triton X100) 0,1% (w/v) PIC (Proteaseinhibitorcocktail), 1 mM PMSF (Firma Roche) gemörsert. Die gemörserten Pflänzchen wurden auf dem Drehrad r 20 min, für eine bessere Solubilisierung inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues *tube* überführt und erneut 10 min bei 10000 xg und 4 °C zentrifugiert.

### 3.7.4 Herstellung von Wurzellysat

In einem Keramikgefäß wurden die entnommenen Wurzeln mit flüssigen Stickstoff gemörsert und dazu 600 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 % (v/v) Glycerol, 0,4 % (w/v) PIC (Firma Roche)) hinzugegeben und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend kamen 600 µl Puffer 2 (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 2% Triton 100, 500 mM NaCl) dazu und die Lösung wurde im Kühlraum kopfüber geschüttelt. Danach wurde bei 4 °C 20 min bei 10000 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Proteine mit Chloroform/Methanol-Fällung extrahiert.

### 3.7.5 Herstellung von Chloroplastenlysat

Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Das Chloroplastenpellets (Kapitel 3.6.5) wurde nach dem Auftauen bei 4 °C für 5 min mit 700 xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Zum Pellet wurden 2x Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/ HCL pH 7,6, 8 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerol, 2% (v/v) Triton X-100) zugegeben. Anschließend erfolgte eine Chlorophyllkonzentrationsbestimmung bei 645 nm und 663 nm durchgeführt und daraufhin mit dem 1x Solubilisierungspuffer die Endkonzentration des Chlorophylls auf 1 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde für 30 min auf Rotator-Mixer im Kühlraum inkubiert und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 55.000 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Es folgte die Bestimmung des Proteingehalts des Überstandes mittels Bradford Assay (Kapitel 3.6.7.2). Das Lysat wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.7.6 Isolierung von Stroma

Dem Chloroplastenpellet (Kapitel 3.6.5) wurde das 3-fachen Volumen Lysepuffer (150 µl) zugefügt. Anschließend wurde die Lösung 10 min auf Eis inkubiert, während dessen

mit Druck 10 x auf- und abgemörsert. Nach diesem Schritt wurde eine Chlorophyllbestimmung durchgeführt die Endkonzentration auf 1 mg/ml Chlorophyll eingestellt. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt. Dieses Lysat wurde bei 55000 xg für 10 min der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend eine Proteinbestimmung vom erhaltenen Stroma mittels NanoDrop durchgeführt. Das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen.

### 3.7.7 Dephosphorylierung von Stroma

Folgende Komponenten wurden für den Ansatz zur Stroma-Dephosphorylierung pipettiert:

*Tabelle 7: benötigte Komponenten für ein 200 µl Stroma-Dephosphorylierungsansatz.*

<b>Stromaprotein</b>	<b>200, in µl</b>
10x Lambda Phosphatase Puffer	20
Lambda-Phosphatase	1
10 mM MnCl <sub>2</sub>	20
H <sub>2</sub> O	179

Der Ansatz wurde 1 h lang bei 30 °C inkubiert, anschließend 30 min bei 70°C mit λ-Phosphatase deaktiviert und danach 5 min mit 10000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 2-5 µl 1 M NaOH angelöst. Die Proteinkonzentration wurde mit Lagerlösung (50 mM TrisHCl pH 6,5-7, 2 % (v/v) Triton) auf etwa 1µg\*µl<sup>-1</sup> eingestellt. Der pH-Wert wurde kontrolliert werden und stieg nicht über 7.

### 3.7.8 Anreicherung mittels Heparinsepharose

Heparin ist ein natürlich vorkommendes Glucosaminoglykan und kann für die Affinitätsbindung und als Ligand für eine ganze Reihe von Biomolekülen, wie DNA-bindende Proteine, Plasmaproteine, Lipoproteine, etc. genutzt werden. Heparin (Sigma-Aldrich H7005) besteht aus alternierende Glucuronsäure- und D-Glucosaminresten. Das Polymer ist stark sulfoniert und trägt N-Sulfat-Gruppen am C-2 der Glucosaminoeinheit und O-Sulfat-Ester-Gruppen an verschiedenen Positionen (Abbildung 11). Die Matrix Sepharose 6 Fast Flow besteht aus 6% hochverlinkten Agaroseperlen mit guten Fließeigenschaften und hoher Ladekapazität. Heparin ist über reduktive Aminierung an die Sepharosematrix gebunden, die selbst unter alkalischen Bedingungen stabil ist (<https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/18114298.pdf>).

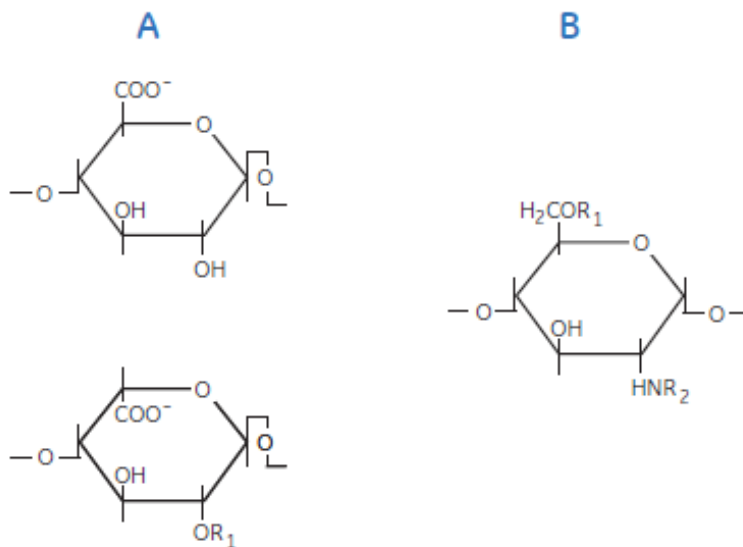


Abbildung 11: Struktur des Heparins aus alternierenden (A) Glucuronsäure oder deren C-5 Epimer, L-Iduronsäure und (B) D-Glucosaminresten  $R_1 = -H$  beziehungsweise  $-SO_3^-$ ;  $R_2 = SO_3^-$  beziehungsweise  $-COCH_3$ .

Der nächste Schritt beinhaltete die Aufreinigung des Chloroplastenlysats (Kapitel 3.7.3). Dieser Prozess besteht aus folgenden Teilschritten: Zunächst wurde ein Aliquot des Lysats aufgetaut und mit dem 1x Solubilisierungspuffer und 2,5 M Ammoniumsulfatlösung so verdünnt, dass eine Ammoniumsulfat-Endkonzentration von 0,2 M erreicht wird. Die mit Heparinsepharose gefüllte Säule wird mit Äquilibriumspuffer (50 mM Tris/ HCL pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 10 % (v/v) Glycerol, 0.2 M Ammoniumsulfat) mit mindestens 10 x Säulenvolumen äquilibriert. Das vorbereitete Lysate wurde 2-mal auf die Gelmatrix mit einer Fließgeschwindigkeit von 2- 2.5 ml / min) aufgetragen. Nichtgebundene Proteine werden durch Waschen mit dem Äquilibriumspuffer (mind. 5 Säulenvolumen) entfernt. Die Elution der matrixgebundenen Proteine erfolgte mittels Stufengradient. Die Elution erfolgte mit 1,5 ml 1 M Ammoniumsulfatlösung in 5-facher Wiederholung mit bereits eluiertem Lysat mit Fließgeschwindigkeit von 0,5- 1,0 ml / min). Anschließend wurde das Eluat für mindesten 8 h im Dialysepuffer (50 mM Tris/HCL pH 7,6, 0.1 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 20 % (v/v) Glycerol, 5 mM DTT) umgepuffert. Dadurch wurde das Ammoniumsulfat sowie störende Bestandteile entfernt. Die dialysierten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Regeneration der Säule erfolgte durch das alternierende jeweils dreifache Waschen mit Puffer (100 mM Tris/ HCl, 0.5 M NaCl, pH 8,5 einstellen) und Puffer (0,1 M Natriumacetat, 0.5 M NaCl, pH 5,0). Nach dem anschließenden Spülen mit Lagerpuffer (50 mM Tris/ HCl pH 7.6, 20% (v/v) Ethanol) wurde die regenerierte Säule im Kühlschrank gelagert.



### 3.7.9 Anreicherung mittels IgG Sepharose

Bei der IgG-Sepharose, handelt es sich um humanes Immunglobulin G, welches kovalent an die Sepharosematrix gebunden ist (Kapitel 3.7.8). Durch das kovalent gebundene IgG wurde eine schnelle Bindung und somit auch Anreicherung von Protein-A-Fusionsproteinen gewährleistet. Die IgG-Sepharose wurde in Ethanol gelagert, welches vor der Benutzung ausgewaschen werden musste. Zunächst wurden 2 mal je 200 µl Amersham IgG-Sepharose-beads in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 1 min, 4 °C und mit 100 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Nach der Zugabe von 1 ml der eiskalter 0,5 M Essigsäure wurde erneut mit 100 xg, 4 °C für 1 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend kam 1 ml eiskalter 1x TBS-Lösung (10 mM Tris/ HCl pH 7,5, 150 mM NaCl), es wurde sanft gemischt und wieder erneut mit 100 xg, 4 °C für 1 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zugaben von 0,5 M Essigsäure und TBS-Lösung wurden nach der beschriebenen Vorgehensweise wiederholt. Nach der Abnahme des Überstands wurde eiskalte 0,1 M Glycinlösung, pH 3,0 hinzugegeben und sanft vermischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 100 xg und 4 °C für 1 min. Der Glycinschritt wurde insgesamt drei mal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml eiskalter TBS-Lösung und Zentrifugation bei 100 xg, 4 °C für 1 min und die Abnahme des Überstandes. Dieser Schritt wurde ebenfalls drei mal wiederholt. Die so gewaschene IgG-Sepharose wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Anschließend erfolgte die Herstellung von einem Pflanzenlysat (Kapitel 3.7.3). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford , (Kapitel 3.7.1.1) und der Berechnung der Gesamtkonzentration an Protein, wurde so viel von dem Pflanzenlysat in ein Reaktionsgefäß pipettiert, dass die Gesamtproteinkonzentration jeweils 200 µg betrug. Die Ansätze werden auf 1,4 ml mit Rensinkpuffer, das PIC und PMSF enthielt, aufgefüllt. Von den Proben wurde eine Ladekontrolle entnommen. Anschließend werden 25 µg der IgG-Sepharose-beads dazu gegeben. Dieses Gemisch wurde nun für 2 h bei 4 °C im Kühlraum auf dem Rotationsrad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C und 100 xg für 1 min. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun werden jeweil 200 µl aus dem Durchfluß abgenommen. Die CK2 samt ihrer Interaktionspartner sollte nun über den Protein-A-Teil im pEarleyGate205-Vektor an die IgG-Sepharose gebunden sein. Es folgte die zweifache Waschung der IgG-Sepharose mit je 1 ml Rensinkpuffer mit PIC und PMSF (100 mM NaCl, 50 mM

Tris7HCl pH 7,5, 0,5 % (v/v) Triton X-100) mit anschließender Zentrifugation und der Verwerfung des Überstandes. Danach wurden die Sepharose-beads vorsichtig in „Mobicol“-Zentrifugationssäulchen (Qiagen) überführt und 5-mal mit Rensinkpuffer mit PIC und PMSF gewaschen. Es folgte die saure Elution der gebundenen Proteine von den Säulchen mit 200 µl 0,1 M Glycin /HCl, 0,1 % TritonX-100, pH 3 hinzugegeben. Diese Säulen wurden anschließend mit Parafilm und einem Stöpsel verschlossen und bei sanftem Mischen 10 min inkubiert. Nach dem vorsichtigen Öffnen folgte eine Zentrifugation bei 100 xg für 1 min. Der Elutionsschritt wurde wiederholt. Die nun erfolgte Zentrifugation für 1 min wurde mit 1000 xg durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt. Mit den gesammelten Fraktionen der Lysate, Durchflüsse und Eluate wurden Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford (Kapitel 3.7.1.1) und Chloroform/ Methanol-Fällungen durchgeführt (Kapitel 3.7.1.3). Anschließend wurden die Pellets im Probenpuffer so gelöst, dass diese je 25 µg Protein enthielten.

### 3.7.10 Amylosereinigung und Gelfiltration

Die Zellyse und die Reinigung wurde nach dem NEB pMALc5x Reinigungsprotokoll durchgeführt (<https://www.neb.com/products/n8108-pmal-c5x-vector#Protocols%20&%20Manuals>). Für die anschließende Gelfiltration wurde eine XK 16/40 Säule mit dem Sephacryl S 100 nach Anleitung gepackt. Die Säule wurde mit dem Säulenpuffer (20 mM Tris HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol) gespült. Anschließend wurden 5 mg der aufgetragenen Proteinlösung mit dem Säulenpuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 250 µl / min eluiert. Die Auswahl der weiter verwendeten Fraktionen erfolgte nach der Natrium-Dodecyl-Sulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und den Bestimmungen der Proteinkonzentration. Proben mit höchster Reinheit wurden gesammelt und mit Hilfe von Dialyse aufkonzentriert.

### 3.7.11 Radioaktiver Kinaseaktivitätsassay

Radioaktiver Kinaseaktivitätsassay wurde mit 60 nM [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP durchgeführt. Für Phosphorylierungsassay wurden ~ 0,4 µg der rekombinant aufgereinigten Kinase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 20 mM Tris, pH 7,5; 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen. Der Ansatz wurde für 30 min bei 23°C inkubiert und durch Zugabe von Probenpuffer (wässrige Lösung aus 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% (v/v) SDS; 5 % (v/v) Mercaptoethanol, 11 % (v/v) Glycerol, 10 % (w/v) Bromphenolblau) terminiert. Die Phosphorylierungsproben wurden auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen

und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und für 1-3 Tagen auf eine Radiographieplatte aufgelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem BASreader.

### 3.7.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach (Laemmli 1970) mit dem Elektrophoresegerät EPS 260 für alle Gele durchgeführt. Die Größe der Gele betrug 8 x 10 cm, die Dicke der Gele 1 mm, die Stromstärke wurde auf 15 mA pro Gel eingestellt. Für das Trenngel wurde eine Acrylamidkonzentration von 12 % und für das Sammelgel von 5 % benutzt.

*Tabelle 8: Zusammensetzung des Trenngels (ausreichend für 3 Gele)*

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen, ml</b>
wäßrige Bisacrylamidlösung (40 %) ( Firma Roth)	9
Trenngelpuffer (1,8 M Tris/ HCl pH 8,8)	7,5
H <sub>2</sub> O	13,2
TEMED	0,048
10 % (v/v) APS	0,18

*Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammelgels (ausreichend für 4 Gele)*

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen, ml</b>
wäßrige Bisacrylamidlösung (40 %)	2,5
Sammelgelpuffer (1,25 M Tris/ HCl, pH 6,8)	5
H <sub>2</sub> O	12,28
TEMED	0,08
10 % (v/v) APS	0,1

Es wurden je nach Wahl des eingesetzten Kammes 10 beziehungsweise 15 Proben aufgetragen. Alle Proben wurden vorher im Verhältnis 1:1 mit dem SDS- Probenpuffer ((wäßrige Lösung aus 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% (v/v) SDS; 5 % (v/v) Mercaptoethanol, 11 % (v/v) Glycerol, 10 % (w/v) Bromphenolblau) verdünnt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Nach der Beendigung des Laufes erfolgte je nach weiterer

Verwendung der Gelproben eine Coomassie-Färbung des Gels, tryptischer *In-Gel* Verdau für die anschließende massenspektrometrische Untersuchung der Proben oder ein Transfer der Proteine auf eine Membran.

### 3.7.13 Western Blot

Die Übertragung der Proteine von einem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran erfolgte mittels eines Drei-Puffer-Systems (*semi-dry* Verfahren). Hierzu wurde das Gel für 5 min im Kathodenpuffer (25 mM Tris/ HCl, 40 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 % (v/v) Methanol, 0,1% (w/v) SDS pH 9,4) inkubiert. Parallel dazu wurde die PVDF-Membran für 5 min in Methanol eingeweicht und anschließend für 5 min im Anodenpuffer II (25 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Methanol pH 10,4;). Anschließend erfolgte der Aufbau des Blots nach der Abbildung 12. Um den Transfer der Proteine auf die Membran zu gewährleisten, wurden eine Stromstärke von 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Membran angelegt. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen und über Nacht getrocknet. Die trockene Membran wurde zunächst für 5 min in Methanol aktiviert, anschließend 2-mal für 1 min mit Wasser gewaschen und dann 2 h im Blockierlösung (5% (w/v) Magermilchpulver, 1x TBS, 0,05 % (v/v) TWEEN 20) inkubiert. Nun erfolgte die über Nacht Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Membran wurde dann 4-mal für jeweils 5 min mit der Waschlösung ( TBS bei allen verwendeten Antikörpern, lediglich bei anti-RCA (pT78) wurde PBST verwendet) gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper behandelt. Nach der Inkubation erfolgten erneut die Waschschrte mit der Waschlösung Nach der anschließenden Überschichtung der Membran mit 1 ml der ECL-(Chemilumineszenz)-Entwicklerlösung (50 % (v/v) AceGlowTM Lösung A (Luminol-Lösung), 50% (v/v) AceGlowTM Lösung B(Peroxid-Lösung)) und 5 min Inkubation (im Dunkeln) erfolgte die Detektion der Signale mittels Fusion Fx7 der Firma Peqlab.

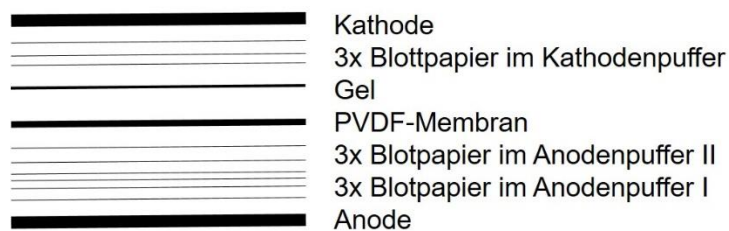


Abbildung 12: Blotaufbau

Zum Herstellen der Blockier- und Waschlösung wurden 10x TBS (100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5) bzw 10x PBS (750 mM NaCl, 30 mM KCl, 45 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) verwendet. Der Anodenpuffer I beinhaltetete 3 M Tris, 10 % (v/v) Methanol, pH 10,4.

### 3.8 Massenspektrometrie/ Proteomics

#### 3.8.1 Probenvorbereitung

##### 3.8.1.1 Tryptischer In-Lösungs-Verdau

Die Pellets aus der Proteinfällung wurden in 223 µl 25 mM Ammonium-Hydrogencarbonat-Puffer (pH 8,5) resuspendiert. Um die Solubilisierung zu unterstützen, wurden 12,5 µl „RapiGest SF“ (0,1% (w/v), Waters, Eschborn, Deutschland) zugegeben und die Proben bei 80°C für 10 min inkubiert. Um Cysteinseitenketten zu reduzieren, wurde 6,2 µl einer 10 mM Dithiothreitol-Lösung zugeben und nach dem Vortexen für 10 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Cystein-Reste durch Zugabe von 6,2 µl 30 mM Iodacetamid alkyliert (Inkubation im Dunkeln, 30 min, bei RT). Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht durch Zugabe von 1 µg Trypsin (Promega) mit Inkubation bei Raumtemperatur. Der Verdau wurde durch Zugabe von HCl gestoppt, die Lösung zentrifugiert (16000 xg, 30 min, 4 °C) und der Überstand mit den tryptischen Peptiden abgenommen. RapiGest, Dithiothreitol, Iodacetamid wurden in 25 mM Ammonium-Hydrogencarbonat-Puffer und Trypsin in Trypsin-Resuspensions-Puffer (50 mM Essigsäure, Promega) gelöst und anschließend 40 µg Protein mit 90 % Aceton fällen. Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte ist in der Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Übersicht der Arbeitsschritte eines In-Lösungsverdaus.

Funktion	Reagenz	Zeit	Temperatur, °C
Solubilisierung	25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8,5 0,1% Rapigest	10 min	80
Reduktion der Thiolgruppen	10 mM DTT (in 25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	10 min	60°C
Alkylierung der Thiolgruppen	30 mM Iodacetamid (in 25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	30 min	RT im Dunkeln
tryptischer Verdau	0,5 µg/µl Trypsin (1:100)	Über Nacht	37
Abstoppen des Verdaus	1µl 37 % HCl		RT
MS-Probenvorbereitung	20 µl MS-Probenpuffer	5 min	RT, Ultraschall
	Zentrifugation	3 min	RT, 10.000xg

Für HDMS<sup>E</sup> (*high definition mass spectrometry*) wurden 9 µl Peptidextrakt (Zentrifugationsüberstand) mit 1 µl einer 10 fmol/µl „spike-Lösung“ (tryptisch verdaute Glycogenphosphorylase B) in ein spezielles Gefäß überführt und an Massenspektrometer Synapt G2S (Waters, Eschborn) analysiert.

### 3.8.1.2 Tryptischer In-Gel-Verdau

Alle für den tryptischen In-Gel-Verdau verwendeten Lösungen wurden frisch und nur mit „HPLC (*high pressure liquid chromatography*)- Grad“ Wasser angesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in der Tabelle 11 aufgeführt. Die Gelstücke wurden 2-mal mit 100 µl H<sub>2</sub>O gewaschen (10 min schütteln, RT) und anschließend mit 100 µl Entfärbelösung auf die Gelstücke gegeben (8-mal, 15 min schütteln, RT, Überstand verwerfen). Anschließend wurden die Gelstücke 2-mal mit H<sub>2</sub>O, einmal mit 100 µl Acetonitril (ACN) gewaschen und im Vakuum bei 30°C getrocknet. Um die Cysteinseitenketten der Proteine zu reduzieren wurde die getrockneten Gelbanden mit 120 µl Reduzierungslösung versetzt, zunächst für 5 min bei RT geschüttelt und anschließend 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Gelbanden mit ACN gewaschen (15 min, RT, schütteln). Zur Alkylierung der reduzierten Cysteinseitenketten wurden die Gelstücke in 120 µl Alkylierungslösung inkubiert (30 min, RT, im Dunkeln) und anschließend mit 100 µl Entfärbelösung gewaschen (10 min, RT, schütteln). Die Gelstücke wurden nun mit einer Kanüle zerkleinert und mit 70 µl Entfärbelösung versetzt, für 10 min bei RT geschüttelt und im Vakuum bei 30°C getrocknet. Danach erfolgte die Inkubation der Gelstücke über Nacht in 80 µl Trypsinlösung. Zur Extraktion der tryptischen Peptide wurden die Gelstücke mit 80 µl Extraktionslösung versetzt, geschüttelt (40 min, RT), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Gelstücken erneut mit 80 µl Extraktionslösung geschüttelt (15 min, RT), die Überstände der beiden Extraktionen vereinigt und im Vakuum (30°C) vollständig eingeeengt. Die Pellets wurden in 20 µl 2 % (v/v) ACN-Lösung (mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure) resuspendiert (5 min Ultraschallbad), zentrifugiert (15 min, 16000 xg) und die Überstände dann in die Massenspektrometrie- geeignete Gefäße überführt.

Tabelle 11: Puffer und Lösungen für den tryptischen In-Gel-Verdau

Lösung	Konzentration der Komponenten
Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer	100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> pH 8,5
Entfärbelösung	30 % (v/v) Acetonitril
Reduzierungslösung	10 mM DTT
Alkylierungslösung	54 mM Iodacetamid
Extraktionslösung	50 % (v/v) ACN 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure
Trypsinlösung	3 ng/μl Trypsin 50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> pH 8,5 5 % (v/v) Acetonitril

### 3.8.1.3 Titandioxid-Anreicherung (TiO<sub>2</sub>)

Jedes benötigte Arbeitsutensil wurde vor der Durchführung des Experiments gründlich gereinigt. Alle Lösungen wurden in höchstem Reinheitsgrad erworben (wenn möglich MS/HPLC-grade). Alle Puffer und Lösungen sollen frisch vorbereitet sein. Die TiO<sub>2</sub> Anreicherung wurde mit 1 mg Protein durchgeführt. Um die Proteine tryptisch zu verdauen, wurden 500 μg Proteinprobe in 170 μl denaturierendem Puffer (8M Harnstoff in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), pH 8,5) aufgelöst und 5 mM Dithiothreitol hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und Iodacetamid-Lösung in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe der 0,2M Dithiothreit-Lösung in 50 mM AmBic zur Endkonzentration von 5mM wurde die Mischung weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Verringerung der Harnstoffkonzentration auf 1M wurde die Lösung mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer ((NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)) verdünnt. Danach erfolgte eine Trypsinzugabe von 5 μg und eine Inkubation für 12 h (über Nacht) bei 37 °C im Heizblock. Der Verdau wurde durch Ansäuerung mit 1 % (v/v) Trifluoressigsäure (pH 2) gestoppt. Nach der Zentrifugation bei 2500 xg für 5 min bei Raumtemperatur und dem Entfernen des Pellet, folgte eine Aliquotentnahme (50 μg) für die spätere Untersuchung der unangereicherten Probe. Die darauffolgende Entsalzung wurde mit

„Sep-Pak C18 Röhrchen“ (WAT020515) durchgeführt. Diese wurden zuerst mit 2 ml Acetonitril gewaschen und 2-mal mit 1 ml 0,6 % (v/v) Essigsäure äquilibriert. Anschließend wurden die angesäuerten tryptischen Peptide auf die Röhrchen pipettiert. Danach wurde 2-mal mit 1 ml der 6 % (v/v) Essigsäure-Lösung gewaschen. Die Elution der entsalzten Peptide erfolgte 3-mal mit 100 µl 80 % (v/v) ACN/ 0,6 % (v/v) Essigsäurelösung. Die entsalzten Proben wurden ebenso wie die unangereicherten Aliquots weitestgehend lyophilisiert. Mit den entsalzten Proben erfolgt nun die Anreicherung der Phosphopeptide. Dazu wurden (gelbe) Spitzen mit einer Ladekapazität von 200 µl verwendet. Es wurden 2 Lagen des „C8-Filterpapiers“ in passender Größe ausgestanzt und in die gelbe Spitze eingeführt. Die Spitze wurde 4 mm unter dem nun hergestellten Plug abgeschnitten. In den abgetrennten Deckel eines Eppendorf Gefäßes wurde ein Loch geschnitten. In das vorbereitete Loch wurde die zuvor präparierte Spitze hineingesteckt. Die Spitze wurde mit 50 µl Methanol beladen und für 10 min bei 100g zentrifugiert. Methanol wurde entfernt und die Spitze mit 200 µl der 10 mg TiO<sub>2</sub>-beads ((10 mg/ml) in 30 % (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) beladen. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 100 xg für 15 min bei Raumtemperatur. Der Durchfluß wurde entfernt. Auf die nun vorhandene 2 mg beads kann 1 mg Protein geladen werden. Die Spitze wurde mit 200 µl Ladepuffer (80 % (v/v) Acetonitril and 6 % (v/v) Trifluoressigsäure) äquilibriert und mit 100 xg 15 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluß wurde entfernt. Die eingedampfte Restlösung von den Sep-Pak Entsalzungsröhrchen (enthält die nun konzentrierten Peptide) wurde in 400 µl Ladepuffer gelöst. Die Lösung blieb für 5 min auf Eis und wurde anschließend stark gerüttelt und kurz herunter zentrifugiert. Nun erfolgt die Beladung der vorbereiteten gelben Spitzen mit 200 µl der Peptidlösung, in zweier Schritten. Während die erste Beladung mit 150 xg für etwa 20 min bei Raumtemperatur herunter zentrifugiert, bleibt die Restlösung auf Eis. Der Durchfluß wurde zur besseren Ausbeute erneut auf die Spitze geladen. Der nun danach erhaltene Durchfluß der ersten und der zweiten Beladung wurde vereinigt und vollständig eingedampft. Diese Probe dient der Analyse der nicht Phosphopeptide. Die nun in dem C8-Filter befindlichen Phosphopeptide werden mit 200 µl Ladepuffer gewaschen, mit 150 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach erfolgt ein Washschritt mit 200 µl Waschpuffer (50 % (v/v) Acetonitril and 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) und eine Zentrifugation mit 150 xg für 15 min und Entsorgung des Durchflusses. Die Spitze wurde nun mit einem mit Ethanol getränktem fuselfreien



Tuch (Kimtech) von Außen abgewischt. Die Elution erfolgte mit 120 µl Elutionspuffer I ( $\leq 5\%$   $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$  (pH 11)) und einer Zentrifugation mit 150 xg für 15 min bei Raumtemperatur in neue Eppendorfgefäße, die 120 µl 20 % (v/v) Ameisensäurelösung enthielten. Die stark gebundenen Peptide wurden im zweiten Elutionsschritt mit 12 ml Elutionspuffer II (80 % (v/v) Acetonitril, 2% (v/v) Ameisensäure) in dasselbe Eppendorfgefäß eluiert. Das Eluat wurde gerüttelt und kurz zentrifugiert. Der doppelte Elutionsvorgang wurde wiederholt. Die beiden Eluate vereinigt und im Konzentrator vollständig eingedampft.

### **3.8.2 Für die Massenspektrometrie verwendete Geräte**

#### **3.8.2.1 *Linear Ion Trap Mass Spektrometer (LTQ XL der Firma Thermo)***

Um die Qualität und den Erfolg der  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung zu verifizieren, wurden die massenspektrometrischen Messungen der unangereicherten und angereicherten Proben durchgeführt. Dazu wurden die getrockneten Peptide in 20 µl 2 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Ameisensäure gelöst und je 1 µl Probe an der LTQ-XL vermessen. Für die nano-HPLC wurde eine UltiMate 3000 RSLCnano System von Thermo Dionex genutzt. Als Vorsäule fungierte eine „Acclaim PepMan 100, RP C17“-Säule von Thermo Scientific verwendet. Die Hauptsäule war eine „Acclaim PepMap RSLC, TP C 18“ von Thermo Scientific. Der durchgeführte Lauf betrug 120 min mit einem 85 min Gradienten mit Lösung A (0,1 % (v/v) Ameisensäure in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und Lösung B (Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure). Der Verlauf des Acetonitrilgradientes wurde in Tabelle 12 der aufgeführt. Die Ionisierungsmethode war eine „*nano spray ionisation*“. Die Datenaquirierung erfolgte mittels *data dependent acquisition* (DDA), bei der die Peptide der vier intensivsten peaks jeden vollständigen MS-Scans mittels *collision induced dissociation* (CID) fragmentiert wurden.

Tabelle 12: Der Verlauf des Acetonitrilgradienten während der Messung mit LTQ-XL.

Zeitraum, min	Acetonitril, %
0-5	8
5-90	8-40
90-95	40-85
95-105	85
105-110	85-8
110-120	8

### 3.8.2.2 Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer (LTQ Orbitrap Velos Pro)

LTQ Orbitrap Velos ist ein Massenspektrometer, das eine „LTQ Velos™“ duale Ionenfalle mit einem Orbitrap™ Analysator verbindet. The LTQ Orbitrap ist eine LC-MS- und MS-Hochleistungssystem, das schnelle Datensammlung mit hoher Genauigkeit der Massenanalyse verbindet. An der Velos wurden die ungerichteten und zielgerichteten MS-Analysen durchgeführt. Die 7 µl Probe in 2 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Ameisensäure wurden 1:1 mit derselben Lösung verdünnt. Davon wurden 5 µl für die Messung verwendet. Die HPLC wurde mit einer „nano-HPLC EASY-nLCII“ von Thermo Scientific durchgeführt. Als Vorsäule diente „EASY-Column SC001 Pre-Column (RP C18)“ von Thermo Scientific. Die analytische Säule war eine „EASY-Column SC200 (RP C18)“ von Thermo Scientific. Die Dauer des Laufs betrug 180 min. Die verwendete Ionisierungsmethode war die *nano spray ionisation* (NSI). Die Datenaquirierung erfolgte mittels DDA (*data dependent acquisition*), dabei wurden die 20 intensivsten Peaks jedes MS-Scans mittels CID und *multi-stage activation* (MSA) fragmentiert.

### 3.8.2.3 Massenspektrometer Synapt G2S

Die Proben für den *in-vivo* Nachweis der CK2 in Wildtyp wurden mit der Synapt G2-S (Waters, Eschborn, Deutschland) im *high definition mass spectrometry* (HDMS<sup>E</sup>)-Modus analysiert. Dafür wurden die im Labor etablierten Einstellungen von Tabelle 13 verwendet. Für jeden Zeitpunkt wurden 3 biologische Replikate, mit je 3 technischen Replikaten vermessen. Die Probe wurde mit Glykogen-Phosphorylase B (GPB, Waters, Eschborn, Deutschland) *gespiked* (10 fmol/µl), um mittels HI3-quantification quantifiziert zu werden und anschließend 1:2 verdünnt. Für eine analytische Messung

wurde 1 µl Probe aus dem tryptischen Verdau in das LC-*(liquid chromatography)*-MS-*(mass spectrometry)*-System injiziert. Die Probe wurde über einen 120 min Gradienten (Tabelle 13) eluiert und bei einer Laufdauer 140 min analysiert. Vor die Synapt G2S war eine *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) geschaltet (Acquity UPLC System (Waters)). Als Vorsäule wurde eine 5µm „Symmetry® C18-13“ (Waters), als Hauptsäule „Acquity UPLC BEH130 C18“ (Waters) verwendet.

Tabelle 13: LC-Methode. Als Lösung A H<sub>2</sub>O (HPLC-Grade, mit 0,1 % (v/v) FA) und als Lösung B Acetonitril (mit 0,1 (v/v) % FA).

Zeit, min	Lösung A, %	Lösungl B, %
0-1	3	
1-120	3	35
120-121	35	85
121-126	85	
126-126,5	85	3
126,5-140	3	

Der *in vivo* Nachweis der CK2 in komplementierten Pflanzen erfolgte ebenfalls mit der Synapt G2S, es wurde jedoch eine andere Messmethode verwendet. Die Messung erfolgte mittels „schwerer Peptide“ mit *multiple reaction monitoring* (MRM). Die quantitative Proteinmessung einer Zelle beziehungsweise Kompartiments ist eine der grundlegenden Herausforderung der Biochemie, jedoch haben die weit verbreiteten immunchemischen Methoden begrenzt spezifisch und variieren stark in ihren Ergebnissen.

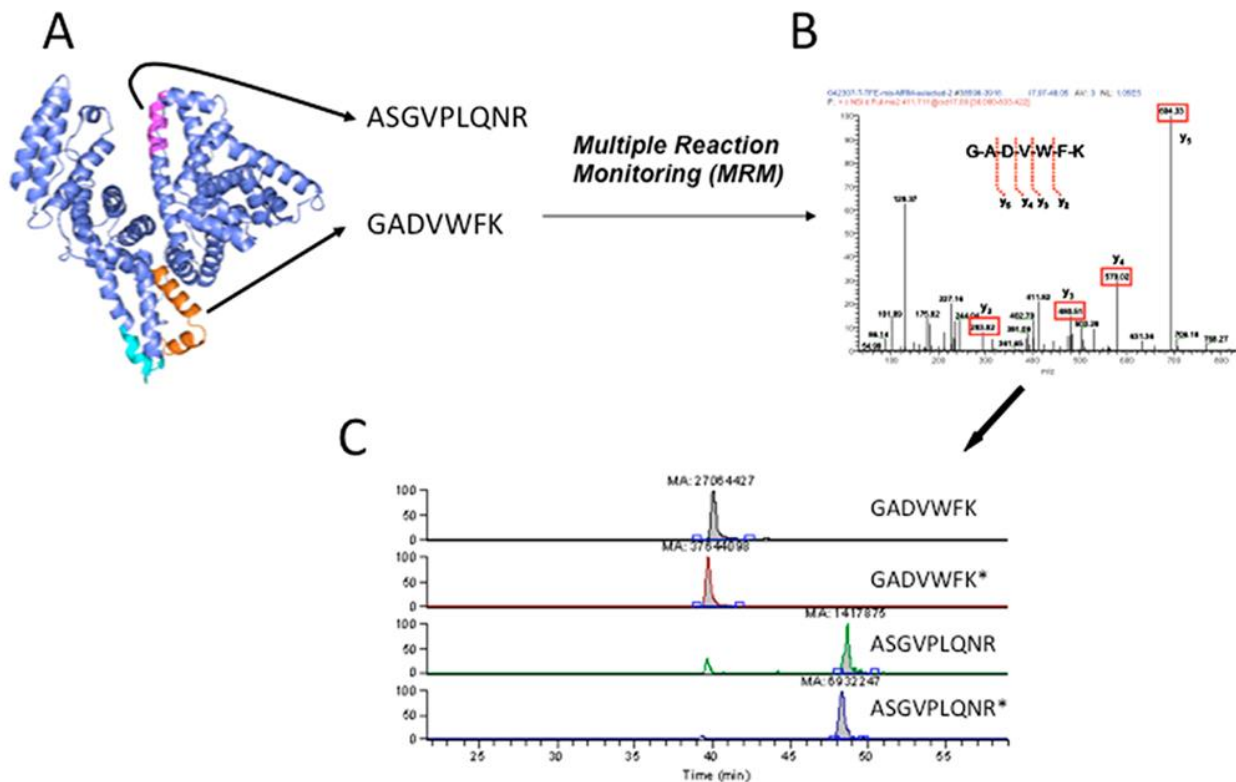


Abbildung 13: Übersicht der gerichteten Proteinquantifikation mittels multiple reaction monitoring (MRM). (A) Auswahl der für das Zielprotein spezifischer Peptide. (B) MRM-spezifische Produkte im MS/MS-Spektren. (C) Integrierte Peakflächen der Signale des Massenspektrums, die einen quantitativen Vergleich der Peakflächen des Zielproteins mit den stabilen Isotop-markierten Referenzpeptiden ermöglichen (Standards) ( aus Liebler und Zimmerman 2013).

Die MRM (Abbildung 13) stellt eine sehr effiziente Methode dar, um Proteine zu quantifizieren. Zunächst werden aus vorangegangenen Experimenten und aus der Literatur Peptide aus den Zielproteinen ausgewählt, die untersucht werden sollen. Die Spezifität der Messung setzt die Auswahl proteotypischer Peptide, deren Sequenz eineindeutig zu dem jeweiligen ausgewählten Protein ist, voraus. Meistens werden tryptische Peptide von 8-25 Aminosäuren Länge verwendet, die mehrfach positiv geladene Ionen bilden, welche mittels MS/MS-Fragmentierung wichtige Sequenzinformationen liefern. Die Peptide, die kürzer als 8 Aminosäuren lang sind, werden aufgrund der nicht Eineindeutigkeit, verworfen.

### 3.8.3 Datenanalyse

#### 3.8.3.1 Programm „Proteome-Discoverer“

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software *Proteome discoverer* (SEQUEST Algorithmus). Die verwendete Datenbank TAIR10 von *Arabidopsis thaliana* wurde um häufig vorkommende Kontaminationen (+crap) erweitert. Folgende Parameter wurden zur Auswertung hinzugezogen:

Tabelle 14: eingestellte Auswerteparameter des Programms „Proteome Discoverer“. FDR= false discovery rate.

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>
<i>Database</i>	TAIR10+crap
<i>Enzyme</i>	Trypsin
<i>Max missed cleavage site</i>	1
<i>Target FDR (strict)</i>	0,01
<i>Target FDR (relaxed)</i>	0,05
<i>Loweste charge state</i>	1
<i>Highest charge state</i>	3
<i>Min. precursor mass</i>	350 Da
<i>Max. precursor mass</i>	2000 Da
<i>Total intensity threshold</i>	0
<i>Min. peak count</i>	1
<i>Precursor mass tolerance</i>	1,2 Da
<i>Fragment mass tolerance</i>	0,8 Da
<i>Modificationas (dynamic)</i>	Phosphorylierung (S, T,Y)

### 3.8.3.2 Programm „MaxQuant 1.3.0.5“

Die Rohdaten der Messungen am Gerät LTQ Orbitrap Velos Pro wurden mit Hilfe der Software „MaxQuant“ unter Standardeinstellungen mit den Parametern in Tabelle 15 ausgewertet.

Tabelle 15: Auswertungsparameter bei Verwendung von „MaxQuant“. FDR= false discovery rate.

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>
<i>Database</i>	TAIR10+crap
<i>Enzyme</i>	Trypsin
<i>first search ppm</i>	20
<i>Main search ppm</i>	10
<i>Max. number of modifications per peptide</i>	4
<i>Max. cleavage sites</i>	2

<i>Max. charge</i>	3
<i>MS/MS tol</i>	20 ppm
<i>Peptide FDR</i>	0,05
<i>Protein FDR</i>	0,01
<i>Site FDR</i>	0,02
<i>Fixed modifications</i>	Carbamidomethyl (C)
<i>Variable modifications</i>	Phospho (S,T,Y) Oxidation (M)

Die Phosphopeptid-Quantifizierung der mit dem Programm „MaxQuant“ gemessener Intensitäten erfolgte durch die Berechnung der Peakfläche und ihre Vergleiche mit Peakflächen anderer Phosphopeptide. Durch die Berechnung der Peakflächen konnte eine Aussage über den Grad der Veränderung der Phosphorylierung getroffen und diese verglichen werden.

### 3.8.3.3 Programm „ProteinLynx Global Server“ (PLGS)

Für die Auswertung der „Synapt“-Daten wurde die Version des Programms PLGS 3.0.1 (Waters, Eschborn, Deutschland) verwendet. Dabei wurde die Auswertung in zwei aufeinanderfolgende Schritte unterteilt.

1. Prozessierung der Rohdaten: Hierbei wertet ein Algorithmus die erhaltenen Spektren aus und ordnet die jeweiligen Fragmentspektren aus dem MS/MS-Scan den „Eltern“-Peptiden aus dem MS-Scan zu. Um eine höhere Massengenauigkeit zu erhalten wurde beim Prozessieren eine Massenkorrektur durchgeführt. Die entsprechenden Parameter werden im *processing parameter file* (Tabelle 16) zusammengefasst.

Tabelle 16: Parameter für die Prozessierung der Rohdaten mittels Programm PLGS.

<b>Parameter</b>	<b>Bezeichnung in PLGS</b>	<b>Definierter Wert</b>
Peakbreite	<i>Chromatographic Peak Width</i>	automatisch
MS TOF Auflösung	<i>MS TOF Resolution</i>	automatisch
Referenzmasse (z=2)	<i>Lock Mass for Charge 2</i>	785,8426 Da/e
Referenzmassenfenster	<i>Lock Mass Window</i>	0,25 Da
MS-Schwellenwert	<i>Low Energy Threshold</i>	180 counts
MS/MS-Schwellenwert	<i>High Energy Threshold</i>	15 counts

Start	<i>Elution Start Time</i>	5 min
Genereller Schwellenwert	<i>Intensity Threshold</i>	750 counts

2. PLGS-Datenbankabgleich: Als Datenbank wurde „TAIR10“ verwendet (TAIR10, ftp://ftp.arabidopsis.org/). Zusätzlich wurden gängige Laborkontaminationen, wie z.B. Keratin (ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP/crap.fasta) und Glykogen-Phosphorylase B hinzugefügt. Die Einstellungen für den Datenbankabgleich wurden in PLGS in den sogenannten *workflow templates* definiert (Tabelle 17).

Tabelle 17: Parameter für den Datenbankabgleich von dem Programm PLGS 3.0.1.

Parameter	Definierter Wert
Suchmaschine	ProteinLynx Global Server
min. Anzahl an Fragmentationen/Peptid	2
min. Anzahl an Fragmentationen/Protein	5
min. Anzahl an Peptiden/Protein	2
max. Proteinmasse	500000
Enzym des Primärverdaus	Trypsin
Enzym des Sekundärverdaus	-
Erlaubte fehlende Spaltstellen	1
feste Proteinmodifikationen	Carbamidomethylierung an Cystein
variable Proteinmodifikation	Oxidation M, Phosphorylierung an S,T,Y
Falsch positive Rate in %	4
Kalibrierprotein zur Quantifizierung	P00489 (Datenbankeintrag von Glykogen-Phosphorylase B)
Konzentration des Kalibrierprotein	10 fmol

Die Protein-Quantifizierung erfolgte durch Zugabe von 10 fmol der Glykogenphosphorylase P00489 als Kalibrierprotein. Die präzise Beschreibung der Funktionsweise siehe (Helm und Baginsky 2018).

#### 3.8.3.4 Programm „MassLynx V4.1“

Die Rohdaten der massenspektrometrischen Messungen der schweren Peptide an der „Synapt G2S“ (*Waters raw file format*) wurden mit der in MassLYnx V4.1 SCN 916 enthaltenen Chromatogram *application* gesichtet und ausgewertet. Das *Total-Ion-Current-* (TIC-) Chromatogramm ist hierbei das Standard-Chromatogramm, welches beim Starten der Chromatogramm-Anwendung angezeigt wird. Zur verbesserten Darstellung und leichterer Interpretation eines Chromatogramms durch eine

scheinbare Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses, wurden diese in der Anzeige geglättet (*smoothing*). Bei Peaks von Interesse wurden die Electrospray-Spektren der Peptide in der ebenfalls in MassLynx enthaltenene *spectrum application* gesichtet und ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden die Signale der schweren Peptide, die sich jeweils genau umbestimmte  $m/z$  unterschieden, in Abhängigkeit der verwendeten schweren Isotope, mit den Signalen der nativen Peptide ins Verhältnis gesetzt.

### **3.9 Massenspektrometrie/ Metabolomics**

#### **3.9.1 Probenvorbereitung**

Erste Extraktion hydrophiler Metabolite: In Kryoextraktionsröhrchen mit verstärkten Wänden (Peqlab, 1,5ml,) wurden 3 Stahlkugeln mit 1 mm und eine mit 3 mm Durchmesser vorgelegt. Anschließend wurden unter kryogenen Bedingungen 150 mg kryogemörsertes Blattmaterial, ohne Auftauen, abgewogen. Zu dem Blattmaterial wurden 900  $\mu$ l Dichlormethan/ Ethanol 2:1 (-80°C) auf Trockeneis hinzu pipettiert und daraufhin 100  $\mu$ l 50 mM Ammoniumacetat. Anschließend wurden die Proben in einem FastPrep24-Homogenisator (MP Biomedicals) aufgeschlossen (5,0 m/s; 3 x 20 sec) und danach bei 4 °C und 10000 xg, 3 min lang zentrifugiert. Etwa 300  $\mu$ l der oberen, wäßrigen Phase wurden abgenommen und in Reaktionsgefäße pipettiert, die auf Wassereis gekühlt waren.

Zweite Extraktion hydrophiler Metabolite: Zum Rest im Probenröhrchen wurden erneut 50  $\mu$ l 50mM Ammoniumacetat hinzu pipettiert und es wurde mit einem „FastPrep24“-Homogenisator (5,0 m/s; 3 x 20sec) ein zweites Mal aufgeschlossen und anschließend bei 4 °C, 10000 xg, 3 min lang zentrifugiert. Etwa 120  $\mu$ l der oberen Phase wurden abgenommen und mit der oberen Phase der ersten Extraktion vereinigt. Alle Zwischenlagerungsschritte erfolgten auf Eis. 180  $\mu$ l des Überstandes wurden über 0,2  $\mu$ M Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore) (4 °C, 10 min, max 800 xg) filtriert. Das Filtrat wurde in die Einsätze von „1,4 ml LC-Gefäße“ pipettiert und sofort vermessen. Die Proben befanden sich bis zur Analyse im Autosampler bei 4 °C.

#### **3.9.2 Für die Metabolitstudie verwendetes Gerät**

Die Metabolitmessungen wurden mittels *liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS) durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde eine „NucleoShell RP18 HPLC“-Säule (150 x 2 x 2.1 mm; Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) (Chromatographie) sowie ein der Massenspektrometer „QTRAP6500“ (Sciex, Toronto, Kanada) eingesetzt. Die Messung erfolgte im sogenannten *scheduled multiple reaction*-Modus.



Dieser erlaubt eine parallele Analyse von besonders vielen Massenübergängen im MS/MS-Betrieb. Alle LC- und MS-relevanten Parameter sind in den Tabelle 37, Tabelle 38 aufgeführt.

### 3.9.3 Datenanalyse

Metabolit-spezifische MRM-Übergänge für 106 Metabolite des zentralen Kohlenstoffwechsels konnten mittels der Software „Multiquant 3.0“ (Sciex) als Peakfläche quantifiziert werden. Diese Rohdaten wurden in „Excel“ importiert und in folgender Weise normiert. Es wurde der Mittelwert aus drei biologischen WT-Replikaten als Basiswert für weitere Berechnungen ermittelt. Für jeden Metaboliten wurde der Quotient aus jedem metabolitspezifischen Einzelwert und dem Mittelwert der Kontrolle gebildet. Zur Herstellung einer normalverteilten Datenmatrix wurden die Quotienten logarithmiert (Basis 10). Dieser „*log-fold change*“-Datensatz univariat (UVA) (*t*-test) und multivariat (MVA) durch *orthogonal partial least structure analysis (oPLSDA)* ausgewertet:

*Univariate Analyse (UVA)*: Der *t*-Test ist der Hypothesentest der *t*-Verteilung. Er wurde verwendet, um zu bestimmen, ob sich zwei Stichproben statistisch signifikant unterscheiden. Meistens wurde der *t*-Test dort eingesetzt, wo die Testgröße normalverteilt war. Wenn nicht anders angegeben, zeigten alle in dem Kapitel diskutierten Metabolitdaten signifikante „*fold-changes*“ basierend auf gepaarten *t*-Tests mit Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

*Multivariate Analyse (MVA)*: Für die Erstellung einer *orthogonal partial least structure analysis (oPLSDA)* der polaren, mit LC-MS gemessenen Metabolitsignale wurde der Datensatz „Pareto“-skaliert. Diese Art der Skalierung betont besonders die großen Änderungen zwischen CK2-Mutante und WT und ist unabhängig von der Intensität des betreffenden Signals.

## 3.10 ChloroPhos 1.0 CHIP

Informationen zu den chloroplastidären Phosphoproteinen von *Arabidopsis thaliana* wurden aus mehreren Experimenten, von denen die meisten sich in der PhosPhAT3.0 Datenbank befanden (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>) zusammengefasst. In der Tabelle 35 sind alle bis 2012 veröffentlichten Studien zur Etablierung einer Phosphopeptiddatenbank aufgelistet. In der Mehrzahl der Arbeiten wurde die komplette Zelle untersucht, nur einige wenige MS-Studien verwendeten Zellorganellen oder isolierte Peptide zu Phosphopeptiddetektion. Insgesamt konnten 376

Phosphoproteine ohne *splice*-Varianten, nach dem Abgleichen mit den Referenztabelle extrahiert werden

Um die Verfügbarkeit der Phosphorylierungsstelle zu sichern, wurden die Peptide so zentriert, dass um die durch die Massenspektrometrie vermutete Phosphorylierungsstelle je 7 Aminosäuren *upstream* und *downstream* der Stelle hinzugefügt wurden. In den Fällen, in denen die Phosphorylierungsstelle nicht eindeutig lokalisiert war, konnten Hydroxylgruppen-tragende Aminosäuren im Phosphopeptid auch in der zentralen Position vorhanden sein. Es wurden zwei kombinatorische Fälle für die Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nachbarschaft eingebaut, um die Anzahl der verschiedenen Phosphopeptide auf dem Chip zu reduzieren. Im Falle von zwei Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nachbarschaft wurde nur die N-terminale Aminosäure zentriert. Falls zwei möglichen Phosphorylierungsstellen durch eine Aminosäure getrennt waren, wurde die Aminosäure zentriert, die zwischen den beiden möglichen Phosphorylierungsstellen positioniert war. Phosphorylierungsstellen am N- oder C-Terminus eines Proteins (beziehungsweise näher als 8 Aminosäuren an einem Terminus) wurden nicht zentriert; stattdessen wurde das passende 15-mer des dem N- beziehungsweise C-Terminus gebildet. Alle Redundanzen auf dem Peptidlevel wurden eliminiert. Nach Anwendung aller dieser Einschränkungen beinhaltete unsere Peptidbibliothek 905 unterschiedliche 15-mers. Weiterhin wurden einige Peptidspots zur Prozess und Inkubationskontrolle und der Einschätzung der Kinaseaktivität hinzugefügt. Tabelle 36 im Anhang beinhaltet die komplette Liste aller Peptide die auf dem Chip mobilisiert wurden. Die selektierten Peptide wurden kovalent mittels Epoxy-functionalisierten Glasobjektträgern über N-(3-(2-(2-(3-Amino-Propoxy)-Ethoxy)-Ethoxy)-Propyl)-Succinsäureamid-Linker am N-terminus mobilisiert.

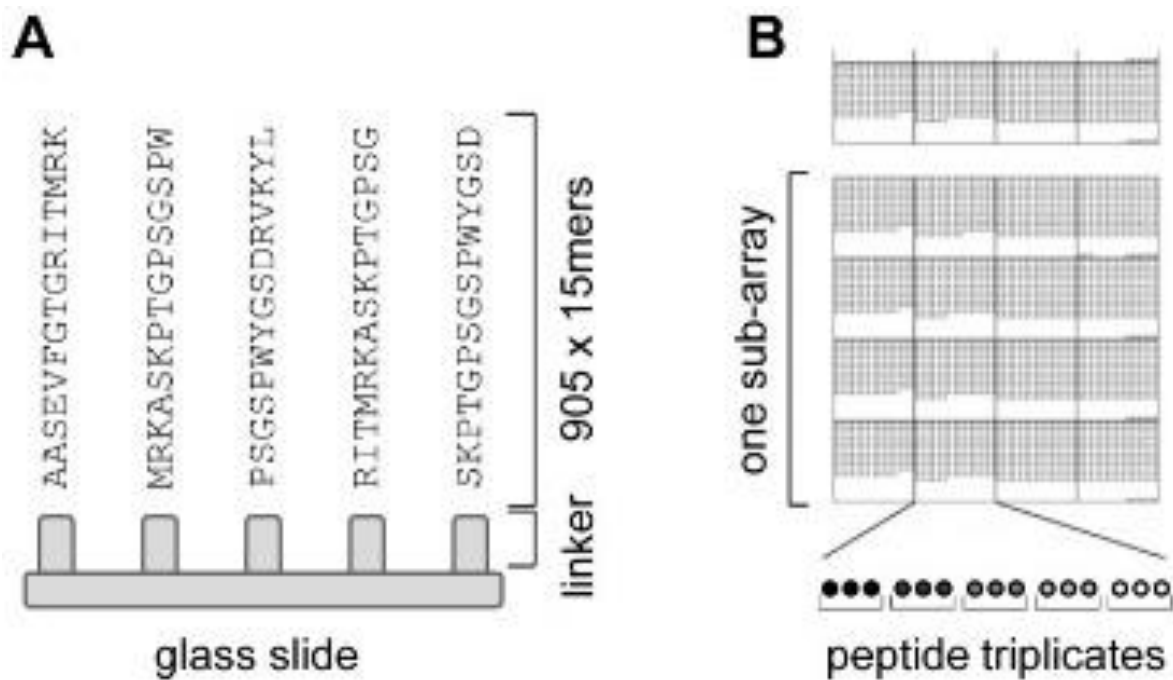


Abbildung 14: (A) Die auf dem Chip mobilisierte Peptide sind über einen Linke mit dem Objektträger verbunden. Die Phosphorylierungsstelle befindet sich am zentralen Aminosäurerest des 15-meren Peptids. (B) Anordnung der Peptide auf dem Microarray. Der Microarray besteht aus 3 identischen Subarrays auf die 905 chloroplastidäre und Kontroll- Peptide gedruckt sind. In jedem Subarray ist jedes Peptid als Triplicat gedruckt. Ein Peptidspot besteht aus ~282 Millionen einzelner Peptidmoleküle, mit einem Durchmesser von 200 µm und 300 µm Zwischenspotabstand (Schonberg et al. 2014).

Die Abbildung 14 verdeutlichte den allgemeinen Aufbau der Peptide auf den Chips. Die Ergebnisse der Promotionsarbeit sind in dem nachfolgenden Kapitel zusammengetragen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der GK615F11-Linie

In allen durchgeführten Experimenten wurde die *ck2*-Linie „GABI Kat 615F11“ (GK615F11) verwendet. Um nicht immer wieder von der Mutante zu sprechen, wurde in der Arbeit auch die tatsächliche Bezeichnung der Insertionslinie verwendet. Die GK615F11-Linie besaß eine T-DNA-Insertionsstelle in ersten Exon des Gens für die chloroplastidäre CK2 (At2g23070). Aufgrund der Gegenläufigkeit der Genexpression der beiden benachbarten Gene beeinflusste die T-DNA Insertion die Promotorregion des benachbarten Gen für die cytosolische CK2 (At2g23080) (Abbildung 15), weshalb es möglich war, dass die Genexpressionen sowohl der cytosolischen als auch plastidären CK2 beeinflusst wurden.

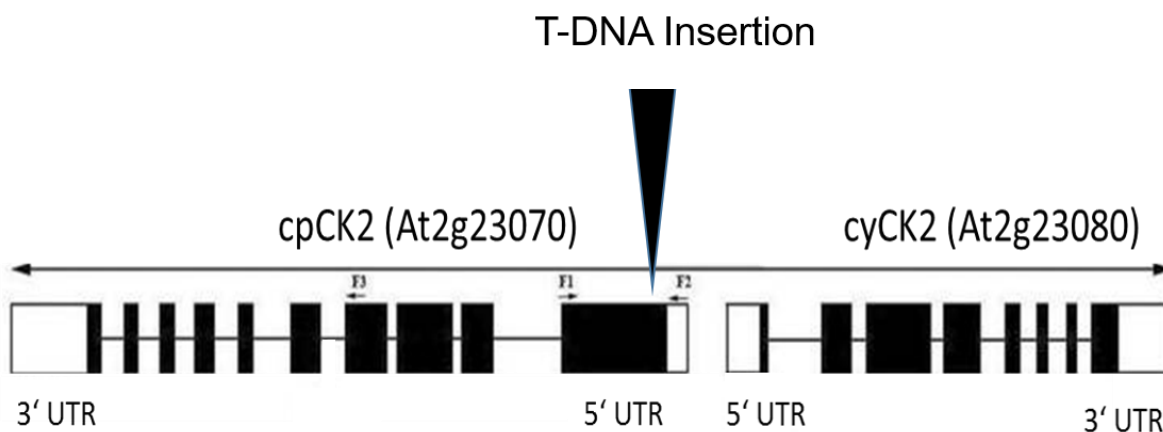


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Positionen der Gene der chloroplastidären CK2 (*cpCK2*) und cytosolischen CK2 (*cyCK2*) und die Positionen der T-DNA Insertionen.

### 4.2 Genetische Charakterisierung der verwendeten Pflanzenlinien

Als Ausgangsmaterial der Experimente standen die heterozygoten F1-Samen der GK615F11-Linie zur Verfügung. Diese wurden in erster Generation weiter vermehrt. Nach den Segregationsgesetzen sollte sich die heterozygote F1 Generation im Verhältnis 1:2:1 aufspalten. 50 % der Individuen bleiben heterozygot, 25% entsprechen dem Wildtyp, 25% homozygote Pflanzen (hybride Kreuzung). Mehrere hundert Pflanzen wurden angezogen. Aufgrund schlechter Keimungsraten konnte die

## Ergebnisse

Segregation nicht beobachtet werden. In der Abbildung 16 wurde ein Beispiel eines *screens* dargestellt.

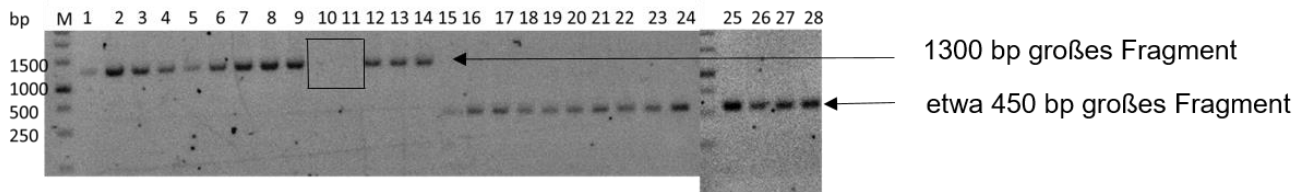


Abbildung 16: Homozygotie-PCR nach der hybriden Kreuzung der F1-Generation. 0,8 %iges (w/v) Agarosegel. 1-14: PCR mit FW\_WT+RV\_WT Primern. 15-28: PCR mit den FW\_CK2+RV\_CK2-Primern. Die unter der Nummer 10 und 11 geführten Pflanzen (schwarz eingerahmt) waren homozygot.

Auf der DNA-Ebene konnte die Homozygotie der verwendeten Pflanzen durch mehrmaliges Wiederholen der PCR mit den spezifischen Primern immer wieder gezeigt werden. Wie in Abbildung 16 ersichtlich, wiesen die 14 heterozygoten *gescreenten* Pflanzen ein 1300 bp großes Fragment auf, welches der plastidären CK2 entspricht (WT-Gen) (Reaktionen 1-14). In den Pflanzen 10 und 11 fehlte jedoch diese Bande, es erfolgte also keine Amplifikation der DNA. Der zweite Teil des *screens* mit FW\_CK2+RV\_CK2-Primern (Reaktionen 15-28), zeigte eine Bande bei etwa 450 bp. Die Pflanzen, die nur diese Bande aufwiesen waren homozygot. Der Erhalt der Homozygotie wurde durch stichprobenartige Auswahl der zum Experiment verwendeter Pflanzen und die Durchführung der Homozygotie-PCR mit diesen gewährleistet. Alle folgenden Experimente wurden ausschließlich mit homozygoten Pflanzen durchgeführt.

### 4.3 Phänotypische Charakterisierung des Wachstums der mutanten *ck2*-Pflanzen

Bereits während der Homozygotie-Selektion fiel der ausgeprägte Phänotyp der *ck2*-Pflanzen auf. Die Ausprägung des Phänotyps war jedoch sehr heterogen. Die Mutante keimte auf Erde angezogen einige Tage später als der Wildtyp. Auf dem  $\frac{1}{2}$  *Murashige Scoog*-(MS)-Agar mit 1 % (w/v) Saccharose war die Keimung nur um 1 Tag verzögert. Die adulten Rosetten aus denen die Blütenstände schossen, waren bei dem Wildtyp wesentlich größer (Abbildung 17). Während beim Wildtyp die Blütenstände komplett ausgebildet und die Schoten am Heranreifen waren, war die GK615F11 gerade dabei die Blütenstände auszubilden (Abbildung 17). Zum Zeitpunkt der Blüte wurden auch

## Ergebnisse

halb so große Rosetten und Blütenstände entwickelt, mit weniger Schoten und Samen als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

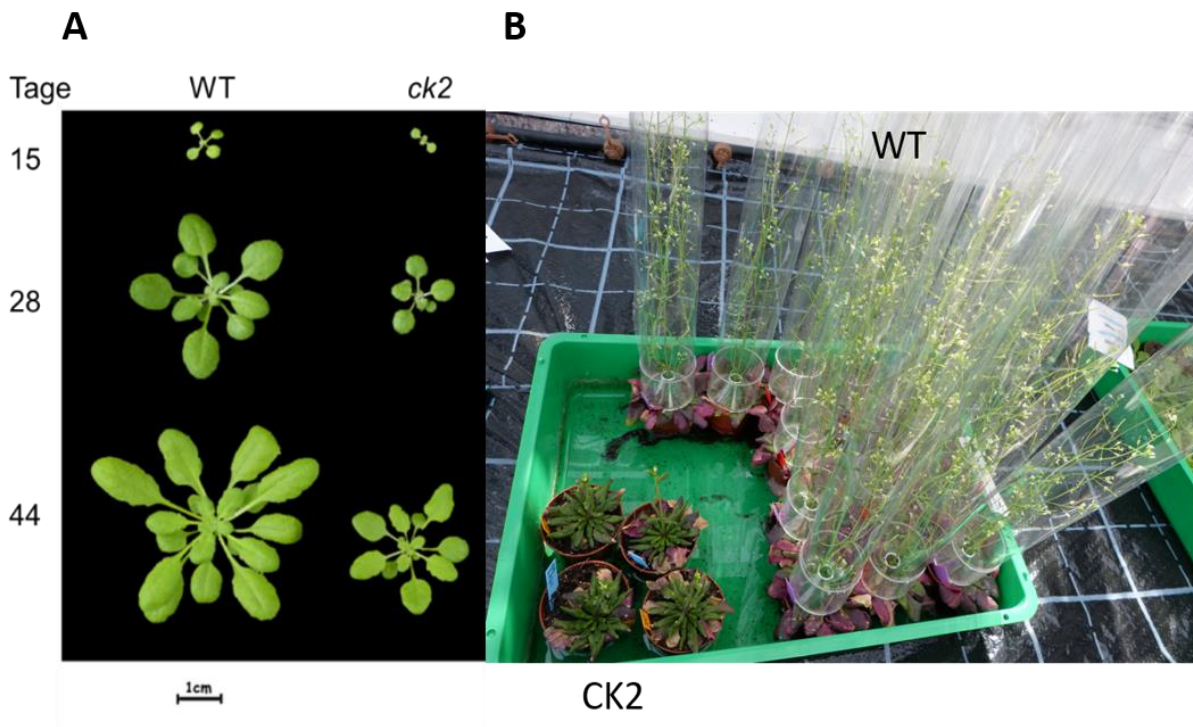


Abbildung 17: Wachstumsvergleich auf Erde zwischen Wildtyp, und *ck2*-Mutanten (GK615F11) im Kurztag-Phytoschrank (A) beziehungsweise die darauffolgende Blühphase im Gewächshaus (B).

Nach dem die homozygote Zuchtlinie der GK615F11 etabliert war und der optische Phänotyp in Form eines verzögerten Wachstums sichtbar wurde, befasste ich mich mit der Frage ob die verzögerte Entwicklung der oberirdischen Pflanzenbestandteile mit dem verlangsamten Wurzelwachstum einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Wurzeln in ihrem Wachstum stark retardiert waren (siehe Abbildung 18 A).

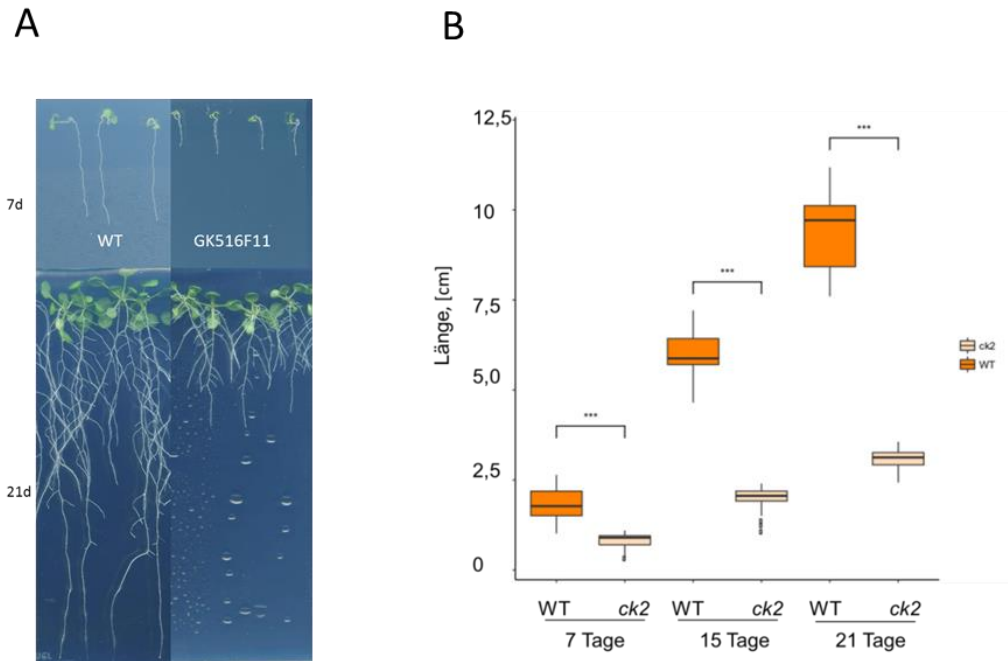


Abbildung 18: A: Wurzellängenvergleich von Wildtyppflanze und GK615F11 nach 7 und 21 Tagen im Kurztag-Phytoschrank. B: Die Altersabhängigkeit der Wurzellängen der Wildtyppflanzen und der GK615F11 in Form eines Shapiro-Tests ( $N > 30$ ).

Das Wurzellängenwachstum wurde nach 7, 15 und 21 Tagen kontrolliert. In der Abbildung 18 wurde die Wurzellänge des Wildtyps im Vergleich zu der der *ck2*-Mutante dargestellt. Deutlich erkennbar waren die wesentlich kürzeren Wurzeln von Beginn der Entwicklung an. Die Wurzellängen zeigten deutlich, dass das Wachstum der *ck2*-Mutanten-Wurzeln stark verlangsamt war. Bereits der Keimungszeitpunkt war bei den Mutanten-Pflanzen verschoben. Innerhalb der zweiten Wachstumswoche verdreifacht sich die Länge der Wildtypwurzeln, die der *ck2*-Mutante wurde knapp verdoppelt. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante war geringer. Da zeigte die GK615F11-Pflanzenlinie einen sehr starken Wachstumsphänotyp sowohl im Bereich der äußeren Pflanzenorgane als auch in Wurzeln. Die äußere Farbe der Pflanze, ihre Fähigkeit zum Blühen und zur Samenzeugung wurde durch die Mutation nicht beeinflusst, denn auch die *ck2*-Pflanzen erzeugten keimungs- und wachstumsfähige Samen (Daten nicht gezeigt). Die Normalverteilung der Proben war nicht eindeutig feststellbar, daher wurde zur Beurteilung der Signifikanz, das Shapiro-Testverfahren genutzt, das sowohl für normalverteilte als auch für nicht normalverteilte Proben angewandt werden kann (Abbildung 18 B).

#### 4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der *ck2*-Pflanzen

Da das äußere Erscheinungsbild der *ck2*-Linie so stark ausgeprägt war, wurde davon ausgegangen, dass auch der innere Aufbau der Chloroplasten verändert sein könnte. Um dieser Frage nach zu gehen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Wildtyppflanzen und der Mutanten-Linie im Alter von 2 bzw. 4 Wochen gemacht. Es sollte elektronenmikroskopisch untersucht werden, ob die Mutation im Verlauf der Entwicklung der Pflanze Einfluss auf die Struktur der Chloroplasten hat.

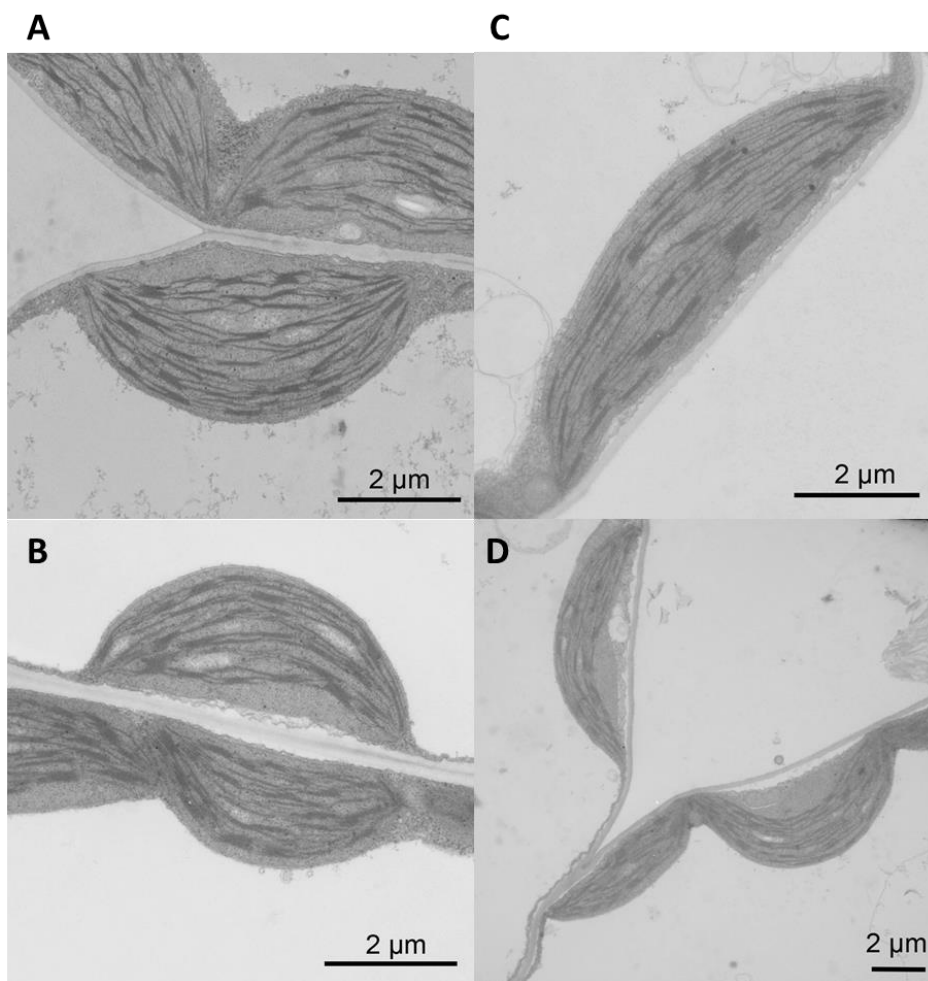


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Chloroplasten. A: 2 Wochen alte Columbia 0 Wildtyp-Chloroplasten. B: 4 Wochen alte Columbia 0 Wildtyp-Chloroplasten. C: 2 Wochen alte *ck2*-Chloroplasten. D: 4 Wochen alte *ck2*-Chloroplasten.

Die elektronenmikroskopische Aufnahmen der Wildtyp- und *ck2*-Chloroplasten zeigten sowohl bei 2 als auch bei 4 Wochen alten Pflanzen vollkommen unauffällige Chloroplasten, mit gut ausgeprägten Grana-Stapeln (Abbildung 19). Nach der phänotypischen Charakterisierung der Pflanzen wurde untersucht, in wie fern die beiden T-DNA-Insertionen die Genexpression beeinflussen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Ausprägung des Phänotyps auf die T-DNA-Insertion im Gen für die



chloroplastidäre CK2 (AT2G 23070) oder auf die T-DNA-Insertion im Nachbarn der cytosolischen CK2 (AT2G23080) zurück zu führen ist. Dazu wurde eine qRT-PCR (quantitative *real time* PCR) durchgeführt. Um jedoch die verlässliche Aussage treffen zu können, musste zunächst die Effizienz der verwendeten Primer bestimmt werden.

#### 4.4.1 *real-time* PCR Effizienzanalyse

Die Berechnung der Amplifikationseffizienz war die erste Analyse, die mit den Primern durchgeführt wurde und war von größter Bedeutung für die korrekte Interpretation der Daten. Im Idealfall verdoppelt sich die Anzahl der Zielsequenzen nach jedem Amplifikationszyklus, was einer Effizienz von 100 % entsprechen würde. Sollte es während der Amplifikation zu keiner Verdoppelung der amplifizierten Sequenzen kommen, würden die Primer nicht effizient sein. Zur Bestimmung der PCR- Effizienz der Primer wurden Standardkurven aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt, aus dessen Steigung die *real-time* PCR Effizienz bestimmt wurde (Abbildung 20). Die Effizienz berechnete sich nach der Formel:  $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ . Eine optimale Effizienz von 2 ergab sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelte. Die Effizienz der Primer wurde in der Tabelle 18 aufgeführt. Die Werte lagen um 2. Somit wurden die Primer als optimal eingestuft und der Expressionsstatus der Mutante mitbestimmt worden.

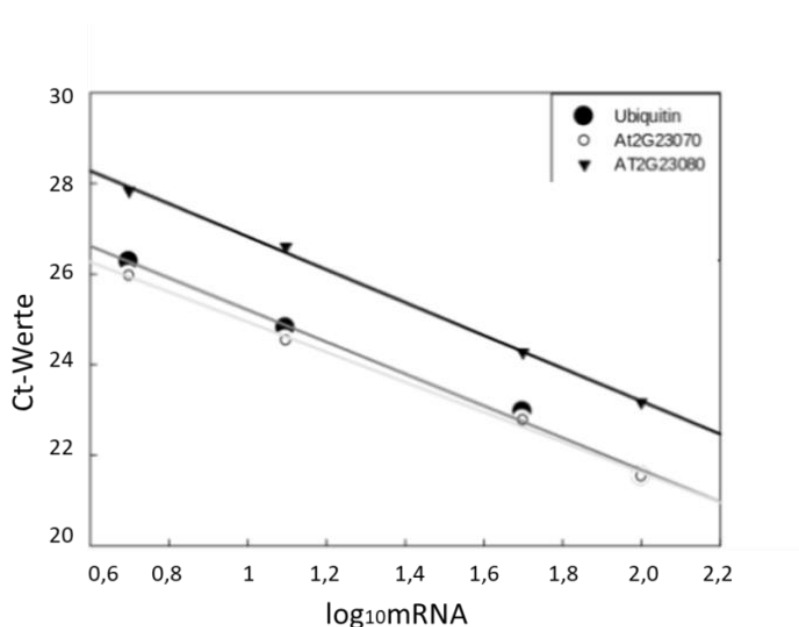


Abbildung 20:  $C_t$ -Werte der quantitativen *real-time* PCR in Abhängigkeit des Logarithmus der mRNA-Menge der Verdünnungsreihe, unter Verwendung spezifischer Primer für die Sequenz von Ubiquitin (schwarze Kreise als Kontrolle), chloroplastidäre CK2 (AT2G23070; weiße Kreise), cytosolische CK2 (AT2G23080; schwarze Dreiecke).

Tabelle 18: Effizienz der für die qPCR verwendeten Primer. Ubiquitin dient als Expressionskontrolle. AT2G23070 plastidäre CK2, AT2G23080 cytosolische CK2.

Primer	Effizienz
Ubiquitin	2.01
AT2G23070	2.01
AT2G23080	1.90

#### 4.4.2 Expressionsstatus *cpCK2* versus *cyCK2*

Aufgrund des verzögerten Wachstums der *ck2*-Pflanzen wurde entschieden zu untersuchen, in wie weit sich die Genexpression zwischen den WT- und der *ck2*-Pflanzen mit dem Fortschreiten des Wachstums der Pflanzen in Blatt und Wurzel ändert. Dazu wurde die quantitative *real-time* PCR im Alter von 2 beziehungsweise 4 Wochen im Blatt- und im Wurzelgewebe durchgeführt. Da das Gen für die cytosolische CK2 das Nachbargen der plastidären CK2 war, musste sichergestellt werden, dass die phänotypische Ausprägung der Mutation auf die plastidäre CK2 zurück zu führen ist und die Expression der cytosolischen CK2 nicht beeinflusst wird. Es wurde geprüft ob die T-DNA Insertion in der cytosolischen und der plastidären CK2 PCR-Produkte ergab oder ob die Insertionen zu einem *knock-out* der beiden Gene führten. Die entsprechenden Sequenzen der Primer wurden im Kapitel 3.4 aufgeführt.

##### 4.4.2.1 Expressionsstatus der CK2 im Blatt

Der Expressionsstatus der cytosolischen CK2 (At2g23080) war im 2 Wochen alten Blattgewebe zwischen dem WT und der *ck2*-Mutante (GK615F11) nicht signifikant verändert (Abbildung 21 A). Die Expression der plastidären CK2 (At2g23070) lag in der Mutante 20 % der Wildtypmenge. Die Genexpression der cytosolischen CK2 änderte sich im Alter von 4 Wochen sowohl im Blatt- als auch im Wurzelgewebe der *ck2* unwesentlich und betrug 100% der Genexpression vom Wildtypniveau. Die Expression der *cpCK2* ist sowohl im Blatt- als auch im Wurzelgewebe der Mutante nach 2 weiteren Wochen Wachstum um weitere 5% gesunken (Abbildung 21 B). In den abgebildeten Originalschmelzkurven (siehe Anhang) ist ersichtlich, dass im Verlauf der *real-time* PCR nur ein Produkt (das Zielgen) gebildet wurde (Abbildung 59).

## Ergebnisse

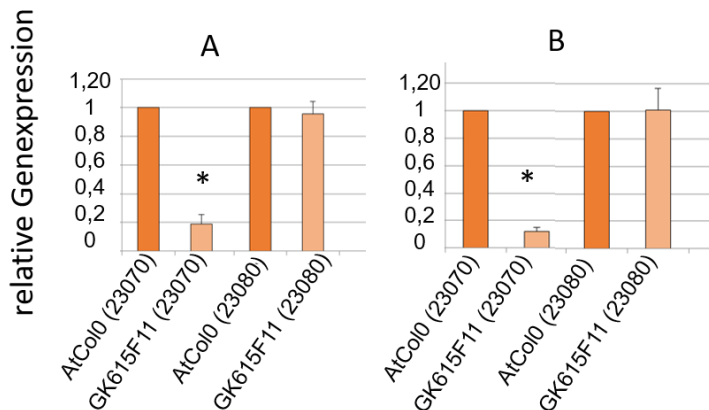


Abbildung 21: Expressionsstatus der cpCK2- und cyCK2-Gene im Blattgewebe der WT- und ck2-Pflanzen im Alter von 2 (A) und 4 (B) Wochen im Kurztag-Phytoschrank.

### 4.4.2.2 Expressionsstatus in der Wurzel

Der Expressionsstatus der cytosolischen CK2 (At2g23080) (cyCK2) war in der 2 Wochen alten Wurzel zwischen dem WT und der ck2-Mutante (GK615F11) nicht signifikant verändert (Abbildung 22). Die Expression der plastidären CK2 (At2g23070) (cpCK2) in der ck2-Linie lag bei etwa 25% der Wildtyps (Abbildung 22). Die Genexpression im Fortschreiten des Wachstums scheint sich auf der Ebene der cytosolischen CK2 nicht zu ändern. Die Expression der cpCK2 ist in der Mutante nach 2 weiteren Wochen Wachstums um weitere 5% signifikant gesunken ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ), wenn man die geringe Expressionsrate von etwa 25% in den ck2-Wurzeln zugrunde legt.

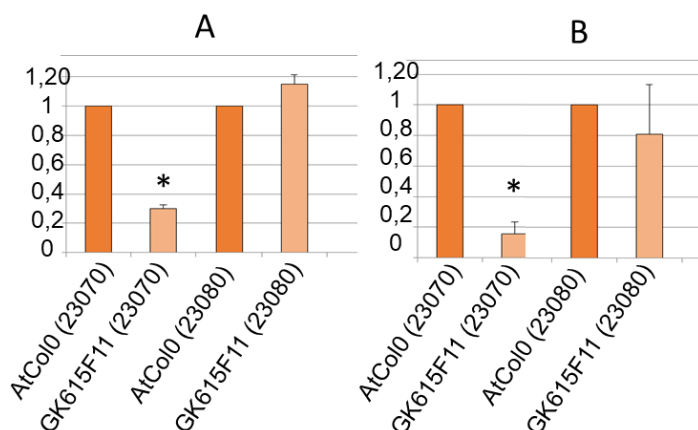


Abbildung 22: Expressionsstatus der cpCK2 und cyCK2 Gene im Wurzelgewebe von WT- und ck2-Pflanzen im Alter von 2 (A) bzw. 4 (B) Wochen im Kurztag-Phytoschrank.

Die Ergebnisse der Genexpression stimmten mit den zu erwartenden überein. Die Genexpressionsniveaus der chloroplastidären CK2 sowohl in den GK615F11-Blättern

beziehungsweise -Wurzeln waren herabgesetzt. Die Genexpression der cytosolischen CK2 war in den beiden Linien konstant.

#### 4.4.3 Komplementation der CK2 Mutation mit Gateway-Klonierung

Um die Ausprägungen des Phänotyps und die Genexpressionsunterschiede auf die Mutation zurückführen zu können, war es nötig, eine Komplementationslinie zu erzeugen, bei der es im Idealfall zur Wiederkehr des Ausgangsphänotyps kommt. Zusätzlich wurde das rekombinante CK2-Gen mit einem *tag* versehen und in die *ck2*-Pflanzenlinie eingeführt, damit man alle an die CK2 gebundenen Substrate beziehungsweise Interaktionspartner über den spezifischen *tag* herausfiltern kann (Kapitel 3.6.5, 3.6.6).

Die Transformationseffizienz (TE) der spezifischen Gateway-LR-Reaktion wurde nach der Formel berechnet:

$$TE [cfu/\mu g \text{ DNA}] = \frac{\text{Anzahl Kolonien [cfu]} * \text{Gesamtvolumen } [\mu l]}{\text{ausplattiertes Volumen } [\mu l] * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{DNA } [\mu g]}$$

Und betrug  $\frac{11 \text{ cfu} * 60 \mu l}{60 \mu l * 1,2 * 0,075} = 122 \text{ cfu}/\mu g_{DNA}$

Cfu steht für *colony forming unit*. Nach der anschließenden DNA-Minipreparation (Kit der Firma Macherey-Nagel) wurden einige Proben zur Sequenzierung geschickt. Der Erfolg der *Gateway-Klonierung* konnte durch die Sequenzierung des Expressionsvektors durch die Firma MWG Eurofins belegt werden (Sequenzen siehe Anhang). Außerdem führten wir unsererseits vorher die entsprechenden PCR-Kontrollen um die Größe und das Vorhandensein der bestimmten PCR-Fragmente zu bestätigen.

## Ergebnisse

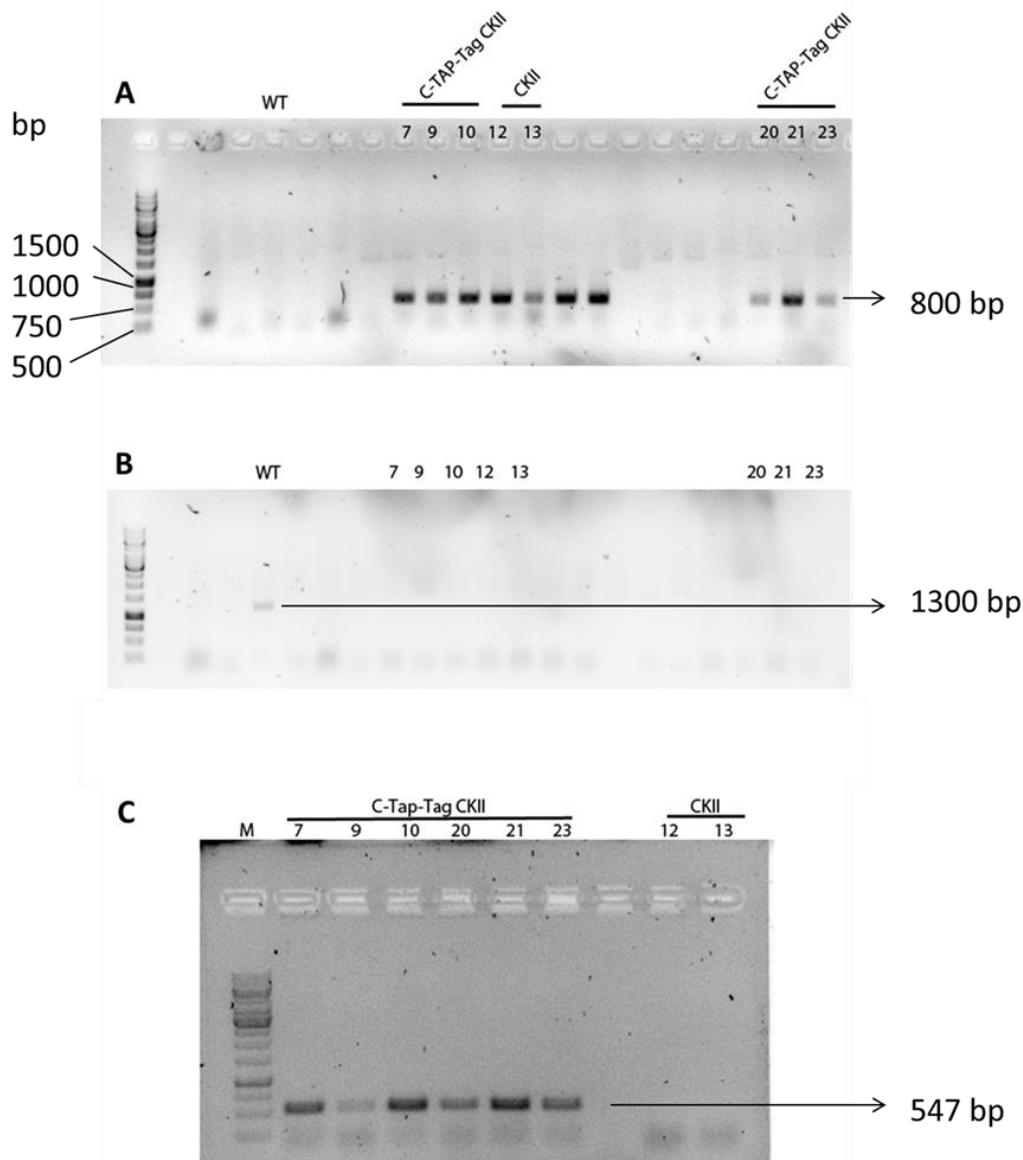


Abbildung 23: Homozygotie-PCR der komplementierten Pflanzen (0,8 % (w/v) Agarosegele). A: PCR mit den T-DNA Insertion spezifischen Primern. B: PCR mit den WT-Primern. C: PCR mit den tandem affinity purification (TAP)-spezifischen Primern.

Auf der DNA-Expressionsebene wurde der Erfolg der Komplementation nachgewiesen. Wie im Bild A mit dem Pfeil gekennzeichnet, ist in allen untersuchten *ck2* und komplementierten Pflanzen die T-DNA spezifische 800bp große Bande sichtbar, die in den WT Pflanzen nicht vorhanden ist. Das im Bild B dargestellte 1300 bp große Produkt in der WT Probe entspricht der plastidären CK2. Daher ist die Bande nur in den WT Kontrollpflanze erkennbar. Die im Bild C mit dem Pfeil gekennzeichnete 547 bp große Bande ist spezifisch für den Tap-tag. Der eine Primer befindet sich im 35S-Promotor des *pEarleyGate205*-Vektors und der andere in der plastidären CK2 Sequenz von *Arabidopsis thaliana*. Die erfolgreiche Klonierung der CK2 in den

Zielvektor war ein vielversprechender Anfang für den Erhalt der komplementierten Pflanze.

#### 4.4.4 Transformation von pEG-CK2 in *Agrobacterium tumefaciens* und „floral dip“

Um die Pflanzen zu selektieren, bei denen das Einschleusen des Zielvektors pEG205 mit der rekombinanten CK2 erfolgreich war, wurden nach dem Abtrocknen der Schoten die kompletten Samen auf  $\frac{1}{2}$  *Murashige-Scoog*-Agarplatten mit Kanamycin ausgesät. Die Fähigkeit auf dem Antibiotikum zu wachsen, also das Kanamycinresistenzgen, haben nur die Pflanzen erworben, die auch den Zielvektor tragen. Zusätzlich wurden die Homozygotiescreens (Abbildung 23) durchgeführt. Nach dem erfolgreichen Untersuchen der komplementierten Pflanzen auf Homozygotie und das Vorhandensein des Expressionsplasmids TAP-Tag-CK2 wurden zunächst phänotypische Untersuchungen der komplementierten Pflanzen angestrebt.

#### 4.4.5 Phänotypische Untersuchung der komplementierten *ck2*-Pflanzen (TAP-CK2)

Nach der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten zur Komplementation der *ck2*-Mutation und anschließender Transformation des Komplementationskonstruktes in *ck2*-Pflanzen wuchsen Pflanzen heran, die phänotypisch beinahe den Wildtyp-Pflanzen entsprachen. Eine eindeutige Komplementation der Mutante ist in der Abbildung 24 zu sehen. Die Mutanten-Blätter sind in jedem Alter deutlich kleiner als die Wildtypblätter.

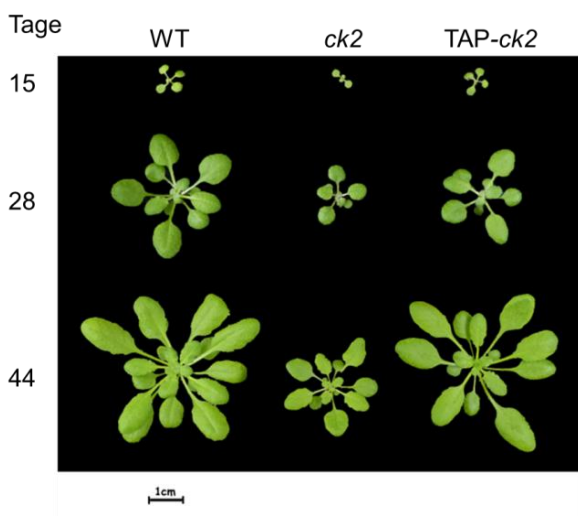


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der phänotypischen Ergebnisse der Komplementation. Wachstumsvergleich des Wildtyps, der *ck2*-Mutanten- (GK615F11) und komplementierter *ck2*-Pflanzen im Kurztage-Phytoschrank (Die Bilder des WT und der CK2 wurden bereits im Kapitel 4.3 gezeigt und wurden um TAP-CK2 ergänzt).

#### 4.4.6 Wurzellängenvergleich WT/ck2/TAP-CK2

Das Wurzelwachstum wurde für 3 Wochen dokumentiert. Eine Komplementation des Phänotyps wurde in der Abbildung 25 dargestellt. Der Phänotyp wurde nicht vollständig komplementiert. Der Keimungszeitpunkt der TAP-CK2 Pflanzen entspricht dem des Wildtyps.

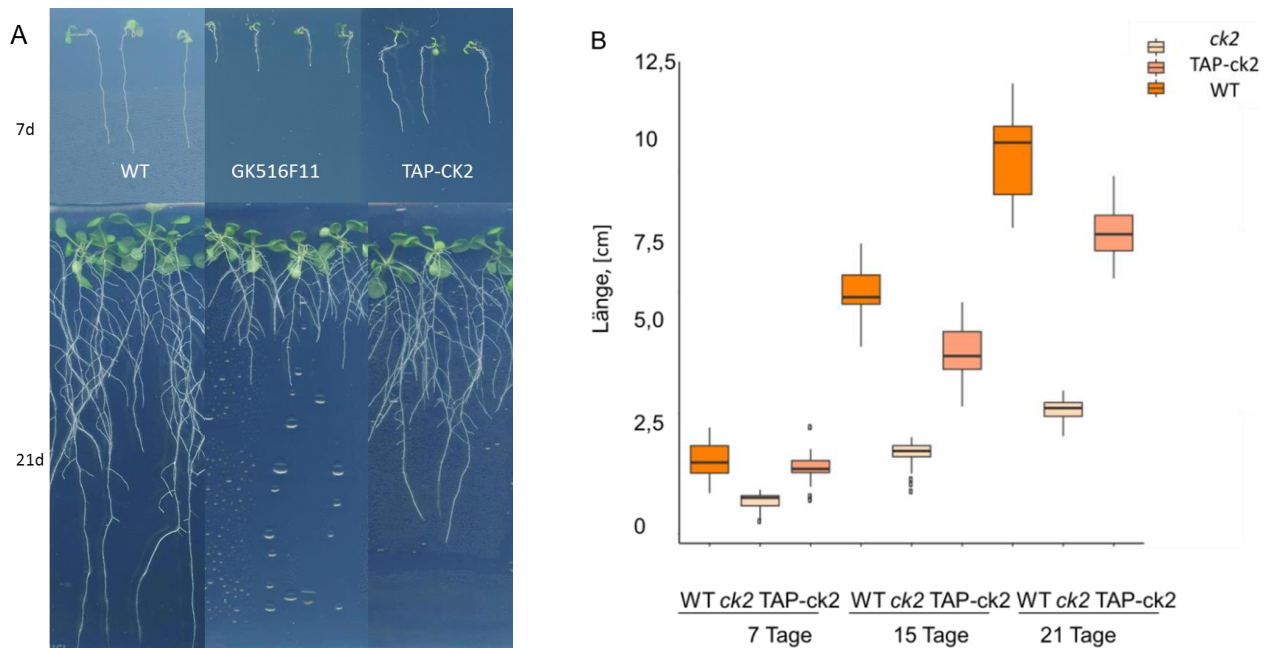


Abbildung 25: A. Wurzellängenvergleich der Wildtyppflanze, der GK615F11-Mutante und der komplementierten Mutante (TAP-CK2), nach 7 und 15 Tagen im Kurztag Phytoschrank. WT, GK615F11-Daten wurden bereits gezeigt und wurden um TAP-CK2 ergänzt. B. Die Altersabhängigkeit der Wurzellängen im Wildtyp, GK615F11-Mutante und in den komplementierten Pflanzen.

Das Wurzellängenwachstum war innerhalb der ersten Entwicklungswochen bei den Wildtyp- und TAP-CK2-Pflanzen nahezu gleich (Abbildung 25). Nach 2 beziehungsweise 3 Wochen wurde jedoch ersichtlich, dass die Komplementation nur etwa zu 80 % erfolgt ist. Nun sollte untersucht werden, in welchem Grade die Genexpression der Komplementationslinie der des Wildtyps entspricht.

#### 4.4.7 Expressionsstatus der komplementierten ck2-Pflanzenlinie

Der Expressionsstatus der komplementierten Mutante wurde analog der ck2-Mutante mittels quantitativer *real-time* PCR durchgeführt. Es wurden zu jeder Messung jeweils 3 technische und 3 biologische Replikate vermessen. Bei der quantitativen *real-time* PCR sollte die Genexpression der komplementierten Pflanzen nachgewiesen und überprüft werden. Eine vollständige Komplementation würde bedeuten, dass die Genexpression in den komplementierten Pflanzen auf das Niveau des Wildtyps steigt.

## Ergebnisse

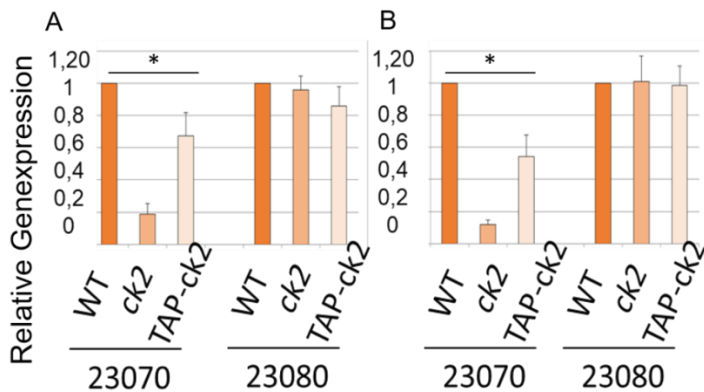


Abbildung 26: Genexpression der plastidären CK2 in WT, *ck2*-Mutanten und den komplementierten Mutanten (*TAP-ck2*) in 2 (A) und 4 (B) Wochen altem Blattgewebe im Vergleich zu der Genexpression des Nachbargens, der cytosolischen CK2 (23080).

Die Komplementation der Genexpression erfolgte zu etwa 70 % des Wildtypniveaus (Abbildung 26). Es ist ebenfalls fest zu halten, dass die Expression der komplementierten Linie das 3,5-fache der Mutanten *ck2*-Pflanzenlinie erreichte. Die Genexpression der cytosolischen CK2 blieb auf dem Niveau des Wildtyps und der Mutante. Wie schon bei der Mutante beschrieben, sank das Expressionsniveau im Laufe des Alterungsprozesses. Bei der komplementierten Linie fiel das Niveau der Expression der cpCK2 von rund 80 % im Alter von 2 Wochen auf knapp 60 % im Alter von 4 Wochen. Das Expressionsniveau der cytosolischen CK2 blieb unverändert (Abbildung 27).

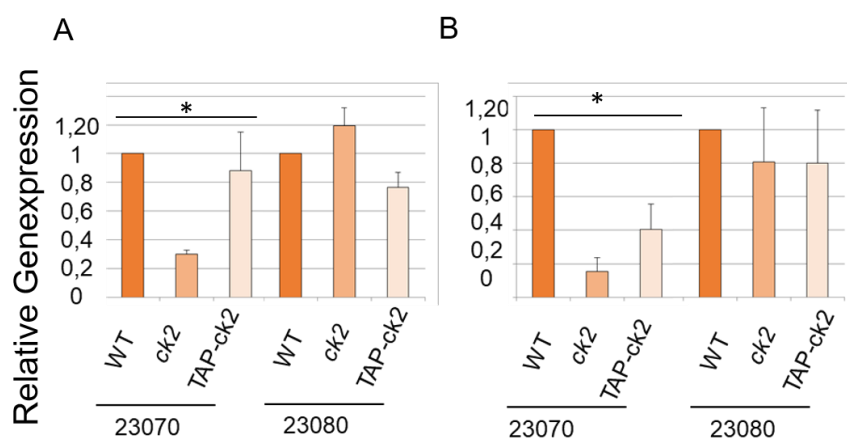


Abbildung 27: Genexpression der plastidären CK2 (23070) im Wurzelgewebe von WT, Mutanten (*ck2*) und den komplementierten Mutanten (*TAP-ck2*) in 2 (A) und 4 (B) Wochen alten im Vergleich zu der Genexpression des Nachbargens, der cytosolischen CK2 (23080).

Auch in Wurzeln konnte die Genexpression der plastidären CK2 nachgewiesen werden. Die Komplementation der Genexpression in Wurzeln erfolgte zu etwa 70 % des Wildtypniveaus (Abbildung 27 A). Es ist ebenfalls fest zu halten, dass die Expression der komplementierten Linie das 3-fache der der mutanten *ck2*-



Pflanzenlinie darstellte. Wie schon bei der Mutante beschrieben, sankt das Expressionsniveau im Laufe des Alterungsprozesses. Bei der komplementierten Linie fällt das Niveau der Expression der cpCK2 von rund 85 % im Alter von 2 Wochen auf knapp 40 % im Alter von 4 Wochen. Das Expressionsniveau der cytosolischen CK2 bleibt unverändert (Abbildung 27 B).

#### 4.4.8 Phosphorylierung in den *ck2*- und TAP-CK2-Pflanzenlinien

Nach der Feststellung des *rescue*-Phänotyps nach der Komplementation mit der rekombinanten CK2, die mit einem TAP-*tag* versehen war und einer deutlichen Steigerung der Genexpressions (80 % des Wildtypniveaus) der plastidären CK2 in den *ck2*-TAP-Pflanzen sollte ebenfalls die Wiedererlangung der Funktion der CK2 verdeutlicht werden. Dazu wurde ein postuliertes Substrat der CK2, die Rubiscoactivase (RCA) verwendet (Kim *et al.*, 2016). Dazu wurde ein pT78-Antikörper verwendet, welcher Aminosäure 78 (T78) in der RCA phosphoryliert (Phosphorylierungsstelle). Mit dem Experiment wurde gezeigt, dass in der Mutante die Phosphorylierungsintensität im Vergleich zum Wildtyp gesenkt ist und in der TAP-CK2 teilweise komplementiert wird. Somit erfolgte zum einen der Nachweis der Phosphorylierungsdefizienz der Mutante als auch eine partielle Wiedererlangung der Funktion in den TAP-Pflanzen. Für dieses Experiment musste die Ernte und die Proteinextraktion im Dunkeln durchgeführt werden, da die Phosphorylierung der Rubisco-Activase unter Lichtausschluß stattfindet.



Abbildung 28: A: Western Blot mit pT78- Antikörper mit WT-, *ck2*- und komplementierten CK2-TAP-Pflanzen. Die Ernte und die Proteinextraktion erfolgte im Dunkeln, nach 16 Stunden Nacht. B die Ponceau S Protein-Färbung als Ladekontrolle (Proteinmenge: 50 µg).

Im Abbildung 28 A ist im Wildtyp sehr deutlich die Phosphorylierung der α- und der β-Isoform der Rubisco-Activase (RCA) erkennbar. Diese beiden Isoformen sind 2

Splicevarianten ein und desselben Gens (Kim *et al.*, 2016). In der Mutanten-Linie fehlt die Phosphorylierung nahezu vollständig. In der komplementierten TAP-*ck2*-Linie ist der Phosphorylierungsstatus höher als in der Mutante. Eine zusätzliche unspezifische Bande (höchstwahrscheinlich die große Untereinheit der Rubisco) war bei diesem Experiment zu beobachten. Die Ponceau S-Färbung (Abbildung 28 B) wurde als Ladekontrolle genutzt. Damit wurde ein erfolgreicher Nachweis der CK2-Funktion in Wildtyppflanzen, der Wegfall der Funktion in den GK615F11-Pflanzen und eine Wiederherstellung der Kinaseaktivität in den TAP-*ck2*-Pflanzen erbracht.

#### 4.4.9 Proteinnachweis der CK2 in Lysaten der WT, *ck2* und TAP-*ck2*-Linien

##### 4.4.9.1 Nachweis mit Antikörpern

Neben einem gelungenen Nachweis der CK2-Funktion beziehungsweise ihres Fehlens sollte ein Proteinnachweis der CK2 erfolgen. Dies wurde zunächst mit den verfügbaren Antikörpern versucht. Um den Anteil an löslichen Proteinen zu variieren wurden Proben mit und ohne Triton vorbereitet (Kapitel 3.7.3). Der erste primäre Antikörper der Wahl war der Antikörper gegen das calmodulinbindende Protein in dem TAP-*tag*, der anti-CBP-Antikörper.

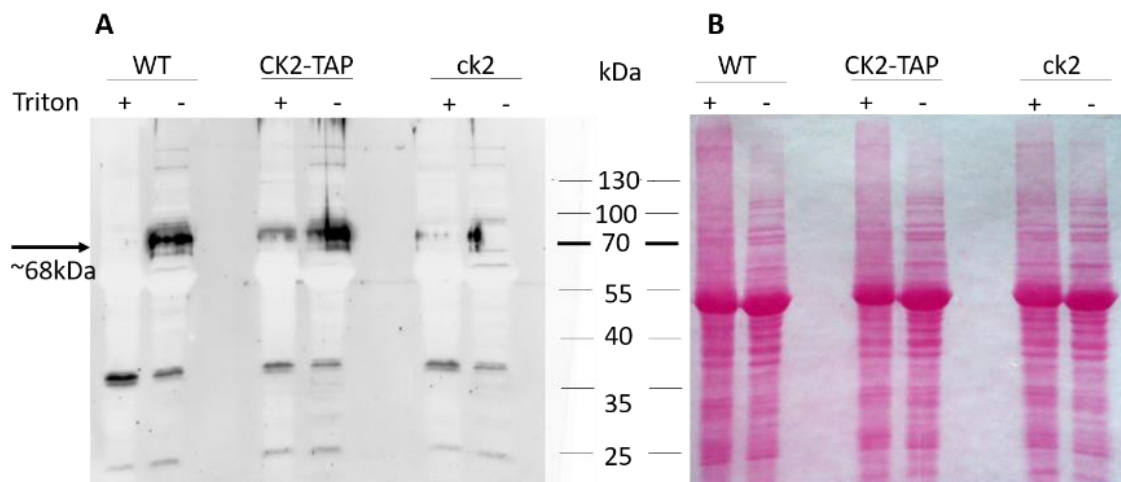


Abbildung 29: A: Western Blot mit anti-CBP (calmodulinbindendes Protein)- Antikörper. B: Ponceaus-S-Färbung des Blots (aufgetragene Proteinmenge 50 µg). Mit dem Pfeil (~68 kDa wurde die Größe der gesuchten CK2 mit dem TAP-tag markiert).

Die gleichmäßige Auftragung der 50 µg Probe wurde im Teil B der Abbildung 29 durch die Ponceaus-S-Färbung aller aufgetragenen Proteine deutlich. Die zu erwartende Bande der CK2 mit dem TAP-Tag wurde bei 68 kDa erwartet (48 kDa CK2 und 20 kDa der TAP-*tag*), jedoch aufgrund der Variation im Laufverhalten wurden die Banden in einem Größenintervall von 62-70 kDa als positive Signale in Betracht gezogen (Pfeil im Teil A der Abbildung 29). Es wurden mehrere Signale in dem zu erwartenden

## Ergebnisse

Größenintervall beobachtet. Unerwarteterweise in allen Proben, sowohl WT, als auch CK2-TAP und in der ck2-Proben. Dies zeugt von den starken unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Unter 0,5% (v/v) Tritonzugabe wurden weniger unspezifische Banden beobachtet. Jedoch gab es keine einzige spezifische Bande die ausschließlich in den TAP-CK2 Proben zu beobachten war. Im nächsten Schritt wurde der zweite zu dem Zeitpunkt verfügbare Antikörper verwendet, der anti-IgG-Antikörper.

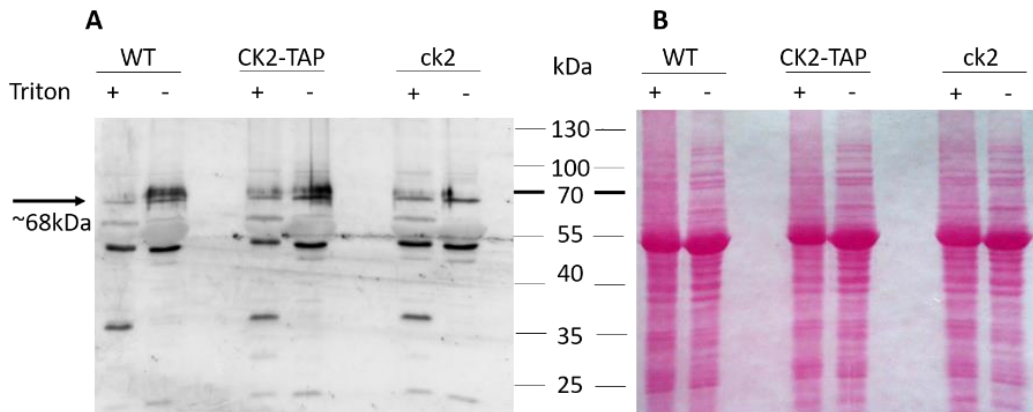


Abbildung 30: A Western Blot mit anti-IgG(Immunglobulin G)- Antikörper. B: Ponceaus-S-Färbung des Blots (aufgetragene Proteinmenge 50 µg). Mit dem Pfeil (~68 kDa wurde die Größe der gesuchten CK2 mit dem TAP-tag markiert).

Leider waren die Ergebnisse dieses Blots, denen des anti-CBP-Antikörpers sehr ähnlich, wobei die Banden präziser waren. Die gleichmäßige Auftragung der 50 µg Protein pro Bande kann dem Teil B der Abbildung 30 entnommen werden. Die Signalbanden waren sehr deutlich, leider sehr unspezifisch. Es gab just bei 68 kDa eine sehr deutliche Band, die jedoch unabhängig von der Probe und Tritonzugabe, in allen Proben vorhanden war (Pfeil bei 68 kDa im Teil A).

Da die Entwicklung neuer Antikörper stetig weiter voranschreitet, wurde nach den neuen verfügbaren Antikörpern recherchiert. Sehr erfolgsversprechend war die Ankündigung der Firma Agrisera, einen anti-chloroplastidären-CK2 Antikörper zu entwickeln. Die Firma stellte den Antikörper zu Testzwecken zur Verfügung.

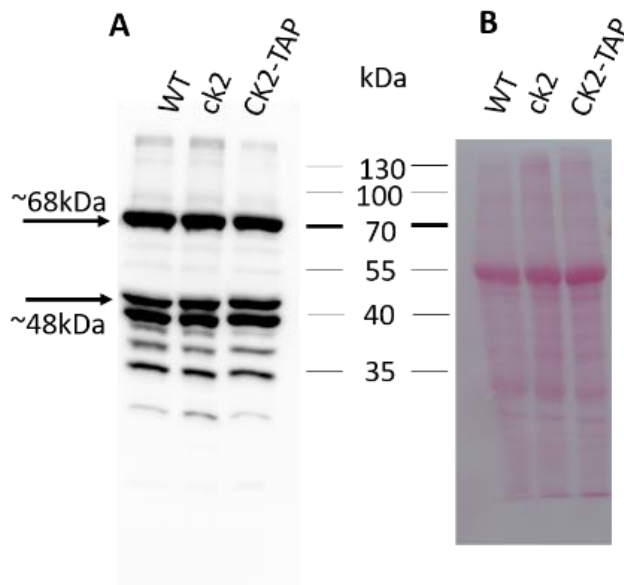


Abbildung 31: Western Blot mit anti-cpCK2-Antikörper. B: Ponceaus-S-Färbung der Proteine (aufgetragene Proteinmenge 50  $\mu$ g).

Da der Antikörper spezifisch die chloroplastidäre CK2 erkennen sollte, wurde erwartet in den WT- (Höhe 48 kDa) und den TAP-CK2-Proben (Höhe 68 kDa) eine deutliche Bande zu erhalten. Die gleichmäßige Auftragung der 50  $\mu$ g Proteine pro Bande wurde in dem Teil B der Abbildung 31 verdeutlicht. Die Ergebnisse des entsprechenden Western Blots waren nicht zufriedenstellend. Anstatt wie bei spezifischen Antikörpern üblich eine zu erwartende Bande zu erhalten, wurden mehrere unspezifische Signale detektiert. Das Bandenmuster aller 3 Proben ist identisch (Abbildung 31 B). Sowohl eine 68 kDa als auch eine 48 kDa große Bande konnte erfolgreich detektiert werden, jedoch in allen 3 Proben. Da die 48 kDa-Bande auch in den *ck2*- und TAP-*ck2*- und die 68 kDa-Bande in den WT- und *ck2*-Proben detektiert wurde, konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um die CK2 handelte. Der zu testende Antikörper brachte leider keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es wurde angenommen, dass die sich in der aufgetragenen Proteinmenge von 50  $\mu$ g befindende Menge an CK2 unter der Detektionsgrenze eines Antikörperblots von 2-10 fmol befand und nicht nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde der Versuch unternommen die CK2 mittels Massenspektrometrie zu detektieren.

#### 4.4.9.2 Proteinnachweis der CK2

Da die Versuche des Nachweises von CK2-Protein mittels Antikörper aus Chloroplastenlysaten misslangen, wurde angenommen, dass trotz der entscheidenden Rolle in den zellulären Prozessen der Zelle die Konzentration der CK2 in der Zelle sehr gering war. Daher wurde eine Anreicherung der Kinasen mittels

Heparin-Sepharose angestrebt. Da die Ergebnisse der Genexpressionmessungen (siehe Kapitel 4.4.2) darauf hin deuteten, dass die CK2 in 14d alten Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* in höherer Konzentration vorkommt, wurde die Anreicherung mit 2 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Die eluierten Fraktionen wurden gesammelt und mittels Dialyse aufkonzentriert. Anschließend erfolgten der tryptische In-Lösungsverdau und die Messung mittels „Synapt G2S“. In den angereicherten 2 Wochen alten Wildtyppflanzen konnte die CK2 nachgewiesen werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Detektierte Proteine (mit AT-Nummern und Beschreibung) in den mittels Heparin-Sepharose angereicherten 14d alten Wildtyppflanzen. Das Protein von Interesse (CK2 mit der AT2G23070 ist in rot abgebildet). Die gemessene Menge an CK2 betrug 1,3 fmol.

AT-Nummer	Beschreibung
ATCG00490	<i>RBCL ribulose-bisphosphate carboxylases</i>
AT1G67090	<i>RBCS1A ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A</i>
AT5G38410	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein</i>
AT5G38420	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein</i>
ATCG00480	<i>ATPB_PB ATP synthase subunit beta</i>
AT5G38430	--- <i>Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein</i>
AT3G15190	--- <i>chloroplast 30S ribosomal protein S20_putative</i>
ATCG01060	<i>PSAC iron-sulfur cluster binding_electron carriers_4 iron_4 sulfur cluster binding</i>
AT5G66570	<i>PSBO-1_OEE1_OEE33_OE33_PSBO1_MSP-1 PS II oxygen-evolving complex 1</i>
ATMG00280	<i>ORF110A Ribulose bisphosphate carboxylase large chain_catalytic domain</i>
AT4G02770	<i>PSAD-1 photosystem I subunit D-1</i>
AT1G03130	<i>PSAD-2 photosystem I subunit D-2</i>
AT2G33800	--- <i>Ribosomal protein S5 family protein</i>
ATCG00830	<i>RPL2 ribosomal protein</i>
AT3G50820	<i>PSBO2_PSBO-2_OEC33 photosystem II subunit O-2</i>
AT4G28750	<i>PSAE-1 Photosystem I reaction centre subunit IV / PsaE protein</i>
ATCG00120	<i>ATPA ATP synthase subunit alpha</i>
ATCG00680	<i>PSBB photosystem II reaction center protein B</i>
AT3G25920	<i>RPL15 ribosomal protein L15</i>
AT1G61520	<i>LHCA3 photosystem I light harvesting complex gene 3</i>
AT4G21280	<i>PSBQ_PSBQA_PSBQ-1 photosystem II subunit QA</i>
ATCG00280	<i>PSBC photosystem II reaction center protein C</i>
AT4G10340	<i>LHCB5 light harvesting complex of photosystem II 5</i>
AT2G20260	<i>PSAE-2 photosystem I subunit E-2</i>
AT2G39730	<i>RCA rubisco activase</i>
AT1G31330	<i>PSAF photosystem I subunit F</i>
ATCG01240	<i>RPS7.2 ribosomal protein S7^AATCG00900 RPS7_RPS7 Ribosomal protein S7p/S5e family protein</i>
AT2G34420	<i>LHB1B2_LHCB1.5 photosystem II light harvesting complex gene B1B2</i>
AT2G34430	<i>LHB1B1_LHCB1.4 light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1</i>
ATCG00540	<i>PETA photosynthetic electron transfer A</i>
ATCG00380	<i>RPS4 chloroplast ribosomal protein S4</i>
AT1G29930	<i>CAB1_AB140_CAB140_LHCB1.3 chlorophyll A/B binding protein 1</i>
AT1G29910	<i>CAB3_AB180_LHCB1.2 chlorophyll A/B binding protein</i>
ATCG00750	<i>RPS11 ribosomal protein S11</i>
AT4G03280	<i>PETC_PGR1 photosynthetic electron transfer C</i>
ATCG00160	<i>RPS2 ribosomal protein S2</i>
AT4G38970	<i>FBA2 fructose-bisphosphate aldolase 2</i>
AT4G04640	<i>ATPC1 ATPase_F1 complex_gamma subunit protein</i>
AT3G01500	<i>CA1_ATBCA1_SABP3_ATSABP3 carbonic anhydrase 1</i>
ATCG00270	<i>PSBD photosystem II reaction center protein D</i>
ATCG00130	<i>ATPF ATPase_F0 complex_subunit B/B'_ bacterial/chloroplast</i>
ATCG00820	<i>RPS19 ribosomal protein S19</i>
AT3G47470	<i>LHCA4_CAB4 light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4</i>
AT5G64040	<i>PSAN photosystem I reaction center subunit PSI-N_chloroplast_putative / PSI-N_putative (PSAN)</i>
AT4G05180	<i>PSBQ_PSBQ-2_PSII-Q photosystem II subunit Q-2</i>
ATCG00020	<i>PSBA photosystem II reaction center protein A</i>
AT3G56910	<i>PSRP5 plastid-specific 50S ribosomal protein 5</i>
AT5G66190	<i>ATLFNR1_FNR1 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1</i>
AT4G32260	--- <i>ATPase_F0 complex_subunit B/B'_ bacterial/chloroplast</i>
AT3G26650	<i>GAPA_GAPA-1 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit</i>
ATCG00770	<i>RPS8 ribosomal protein S8</i>
AT2G07732	<i>Ribulose bisphosphate carboxylase large chain_catalytic domain</i>

## Ergebnisse

AT3G12780	<i>PGK1 phosphoglycerate kinase 1</i>
AT3G54210	--- Ribosomal protein L17 family protein
AT1G42970	<i>GAPB glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit</i>
AT5G01530	<i>LHCB4 light harvesting complex photosystem II</i>
AT1G06680	<i>PSBP-1_OEE2_PSII-P_OE23 photosystem II subunit P-1</i>
AT1G12900	<i>GAPA-2 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2</i>
AT4G09650	<i>ATPD ATP synthase delta-subunit gene</i>
AT2G21330	<i>FBA1 fructose-bisphosphate aldolase 1</i>
ATCG00470	<i>ATPE ATP synthase epsilon chain</i>
AT1G74970	<i>RPS9_TWN3 ribosomal protein S9</i>
AT1G15820	<i>LHCB6_CP24 light harvesting complex photosystem II subunit 6</i>
AT3G27690	<i>LHCB2.4_LHCB2.3_LHCB2 photosystem II light harvesting complex gene 2.3</i>
AT2G05100	<i>LHCB2_LHCB2 photosystem II light harvesting complex gene 2</i>
AT2G05070	<i>LHCB2.2_LHCB2 photosystem II light harvesting complex gene 2.2</i>
AT4G12800	<i>PSAL photosystem I subunit I</i>
AT1G56190	--- Phosphoglycerate kinase family protein
<b>AT2G23070</b>	<b>Protein kinase superfamily protein</b>
AT4G20360	<i>ATRAB8D_ATRABE1B_RABE1b RAB GTPase homolog E1B</i>
AT5G14740	<i>CA2_CA18_BETA CA2 carbonic anhydrase 2</i>
AT1G20020	<i>ATLFNR2_FNR2 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2</i>
ATCG00800	--- structural constituent of ribosome
AT1G55490	<i>CPN60B_LEN1 chaperonin 60 beta</i>
ATCG00330	<i>RPS14 chloroplast ribosomal protein S14</i>
AT3G13470	--- TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
AT1G55670	<i>PSAG photosystem I subunit G</i>
AT3G27830	<i>RPL12-A_RPL12 ribosomal protein L12-A</i>
AT3G27850	<i>RPL12-C ribosomal protein L12-C</i>
AT5G14320	--- Ribosomal protein S13/S18 family
AT3G47070	--- LOCATED IN: thylakoid_chloroplast
ATCG00810	<i>RPL22 ribosomal protein L22</i>
AT2G28190	<i>CSD2_CZSOD2 copper/zinc superoxide dismutase 2</i>
AT3G60750	--- Transketolase
AT3G08940	<i>LHCB4.2 light harvesting complex photosystem II</i>
ATCG00790	<i>RPL16 ribosomal protein L16</i>
AT5G56500	--- TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
AT1G09340	<i>CRB_CSP41B_HIP1.3 chloroplast RNA binding</i>
ATCG00340	<i>PSAB Photosystem I_PsaA/PsaB protein</i>
AT4G24770	<i>RBP31_ATRBP31_CP31_ATRBP33 31-kDa RNA binding protein</i>
AT5G10360	<i>EMB3010_RPS6B Ribosomal protein S6e</i>
ATCG00720	<i>PETB photosynthetic electron transfer B</i>
AT3G62030	<i>ROC4 rotamase CYP 4</i>
AT2G28000	<i>CPN60A_CH-CPN60A_SLP chaperonin-60alpha</i>
AT4G31700	<i>RPS6_RPS6A ribosomal protein S6</i>
AT3G09630	--- Ribosomal protein L4/L1 family
AT1G44575	<i>NPQ4_PSBS Chlorophyll A-B binding family protein</i>
AT5G35630	<i>GS2_GLN2_ATGSL1 glutamine synthetase 2</i>
AT5G02870	--- Ribosomal protein L4/L1 family
AT3G46780	<i>PTAC16 plastid transcriptionally active 16</i>
AT5G20720	<i>CPN20_CPN10_CHCPN10_ATCPN21_CPN21 chaperonin 20</i>
AT1G79850	<i>RPS17_CS17_PRPS17 ribosomal protein S17</i>
AT2G43030	--- Ribosomal protein L3 family protein
AT3G54890	<i>LHCA1 photosystem I light harvesting complex gene 1</i>
AT5G06290	<i>2-Cys Prx B_2CPB 2-cysteine peroxiredoxin B</i>
AT4G02530	--- chloroplast thylakoid lumen protein
AT3G63140	<i>CSP41A chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa</i>
AT3G44890	<i>RPL9 ribosomal protein L9</i>
AT4G37510	--- Ribonuclease III family protein
AT5G23060	<i>CaS calcium sensing receptor</i>
AT5G50250	<i>CP31B chloroplast RNA-binding protein 31B</i>
AT5G08050	--- Protein of unknown function (DUF1118)
AT2G28830	<i>PUB12_AtPUB12 PLANT U-BOX 12</i>
AT5G20290	--- Ribosomal protein S8e family protein
AT3G05590	<i>RPL18 ribosomal protein L18</i>
ATCG00350	<i>PSAA Photosystem I_PsaA/PsaB protein</i>
AT5G27850	--- Ribosomal protein L18e/L15 superfamily protein
AT3G55800	<i>SBPASE sedoheptulose-bisphosphatase</i>
AT1G14320	<i>SAC52_RPL10_RPL10A Ribosomal protein L16p/L10e family protein</i>
ATCG01120	<i>RPS15 chloroplast ribosomal protein S15</i>
AT5G40950	<i>RPL27 ribosomal protein large subunit 27</i>
AT2G38040	<i>CAC3 acetyl Co-enzyme a carboxylase carboxyltransferase alpha subunit</i>
AT1G26910	<i>RPL10B Ribosomal protein L16p/L10e family protein</i>
AT1G66580	<i>SAG24_RPL10C senescence associated gene 24</i>
AT4G01050	<i>TROL thylakoid rhodanese-like</i>

## Ergebnisse

AT1G74470	--- Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein
AT3G23400	FIB4 Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein
AT1G01090	PDH-E1 ALPHA pyruvate dehydrogenase E1 alpha
AT1G71500	--- Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein
AT5G35970	--- P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT3G26060	ATPRX Q Thioredoxin superfamily protein
AT3G49910	--- Translation protein SH3-like family protein
AT3G04790	--- Ribose 5-phosphate isomerase_type A protein
AT3G11630	--- Thioredoxin superfamily protein
AT5G50920	CLPC_ATHSP93-V_HSP93-V_DCA1_CLPC1 CLPC homologue 1
AT1G03600	PSB27 photosystem II family protein
AT2G45290	--- Transketolase
AT1G32060	PRK phosphoribulokinase
AT2G37220	--- RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT4G34620	SSR16 small subunit ribosomal protein 16
AT4G01310	--- Ribosomal L5P family protein
AT3G56940	CRD1_CHL27_ACSF dicarboxylate diiron protein_putative (Crd1)
AT3G48730	GSA2 glutamate-1-semialdehyde 2_1-aminomutase 2
AT2G24540	AFR Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT2G30950	VAR2_FTSH2 FtsH extracellular protease family
AT2G21170	TIM_PDTP1 triosephosphate isomerase
AT3G47650	--- DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein
AT5G47190	--- Ribosomal protein L19 family protein
AT3G52380	CP33_PDE322 chloroplast RNA-binding protein 33
AT5G49910	CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2_HSC70-7_cpHsc70-2 chloroplast heat shock protein 70-2
AT5G54270	LHCB3_LHCB3*1 light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3
AT1G48350	--- Ribosomal L18p/L5e family protein
AT1G02780	emb2386 Ribosomal protein L19e family protein
AT5G63570	GSA1 glutamate-1-semialdehyde-2_1-aminomutase
AT5G07090	--- Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein
AT2G17360	--- Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein
AT5G58420	--- Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein
AT2G01210	--- Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT3G48870	ATCLPC_ATHSP93-III_HSP93-III Clp ATPase
AT5G42270	VAR1_FTSH5 FtsH extracellular protease family
AT1G54780	TLP18.3 thylakoid lumen 18.3 kDa protein
AT4G24280	cpHsc70-1 chloroplast heat shock protein 70-1
AT3G57490	--- Ribosomal protein S5 family protein
AT2G41840	--- Ribosomal protein S5 family protein
AT1G58983	--- Ribosomal protein S5 family protein
AT1G58380	XW6 Ribosomal protein S5 family protein
AT3G45140	LOX2_ATLOX2 lipoxygenase 2
AT1G43170	ARP1_emb2207_RPL3A_RP1 ribosomal protein 1
AT3G54050	HCEF1 high cyclic electron flow 1
AT5G58270	STA1_ATATM3_ATM3 ABC transporter of the mitochondrion 3
AT5G04140	GLU1_GLS1_GLUS_FD-GOGAT glutamate synthase 1
AT5G46100	--- Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT2G20890	PSB29_THF1 photosystem II reaction center PSB29 protein
AT1G54520	--- unknown protein
AT3G62820	--- Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT1G50250	FTSH1 FTSH protease 1
AT4G09010	APX4_TL29 ascorbate peroxidase 4
AT5G14910	--- Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT3G24830	--- Ribosomal protein L13 family protein
AT1G78630	emb1473 Ribosomal protein L13 family protein
AT1G06430	FTSH8 FTSH protease 8
AT2G21530	--- SMAD/FHA domain-containing protein
AT5G40050	--- F-box/FBD-like domains containing protein
AT4G21705	--- Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT4G27880	--- Protein with RING/U-box and TRAF-like domains
AT1G07920	--- GTP binding Elongation factor Tu family protein
AT3G60190	ADL4_ADLP2_EDR3_DRP1E_ADL1E_DL1E DYNAMIN-like 1E
AT3G53460	CP29 chloroplast RNA-binding protein 29

#### **4.4.9.3 Proteinnachweis der TAP-CK2 mittels *multiple reaction monitoring* (MRM)**

Zunächst wurde versucht die TAP-CK2 wie die CK2 in den Wildtyppflanzen mit Heparin-Sepharose Anreicherung nachzuweisen. Der Versuch misslang. Durch den TAP-Tag kommt es möglicherweise zu einer etwas abweichender Konformation der reifen CK2, die die Wechselwirkung mit der Heparin-Sepharose Matrix und damit eine Anreicherung verhindert. Was ebenso möglich ist, dass die niedrige Abundanz der CK2 im Chloroplastenlysat eine Detektion verhinderte. Die Methode der Wahl aufgrund der misslungenen Nachweise war die *multiple reaction monitoring* (MRM)-Methode. Diese Methode basierte auf dem Nachweis der nativen Peptide mit der Hilfestellung der Zugabe künstlich generierter markierter schwerer Peptide. Die Auswahl der Peptide erfolgte auf Grundlage der in den Vorarbeiten zum *multiple reaction monitoring* durchgeführten *high definition mass spectrometry* (HDMS<sup>E</sup>)-Läufe. Bei der *multiple reaction monitoring* Methode wurden synthetische isotopenmarkierte Peptide verwendet, die in definierten Konzentrationen in die Proben *gespiked* wurden. In einem ersten Schritt wurden die Proteine und Peptide identifiziert. Geeignete Proteine wurden dann in einer Auftragssynthese isotopenmarkiert hergestellt. In einem zweiten Schritt erfolgte dann die absolute Quantifizierung der Zielproteine. Die m/z-Werte der *gespikten* schweren Peptide waren bekannt, ebenso wie der Unterschied in m/z-Werten zu den nativen Peptiden von 10, deren m/z-Werte manuell anhand der Spektren durchsucht wurden. Die Übersicht der ausgewählten schweren Peptide und die *In silico* Fragmentierung mit den jeweils gefundenen schweren und Normalpeptiden befinden sich im Anhang (Tabelle 40, Tabelle 41, Tabelle 42, Tabelle 43). Zur Veranschaulichung der Detektion eines b-Ions eines der 4 zur Detektion verwendeten schweren Peptids IELDPNLTSLVGR. Ein nach der Fragmentierung enthaltenes b-Ion des schweren Peptids war IELDP mit der m/z von 966. Wie aus dem lila Spektrum (WT) der Abbildung 32 ersichtlich, wurde das schwere Peptid (symbolisch als Hantel dargestellt) detektiert, der Unterschied im m/z zwischen dem schweren und leichten Peptid beträgt 10. Das leichte Peptid mit m/z von 956 konnte ebenfalls erfolgreich detektiert werden (symbolisch als Feder dargestellt). Weitere nachgewiesene Peptide wurden im Anhang zusammengefasst.



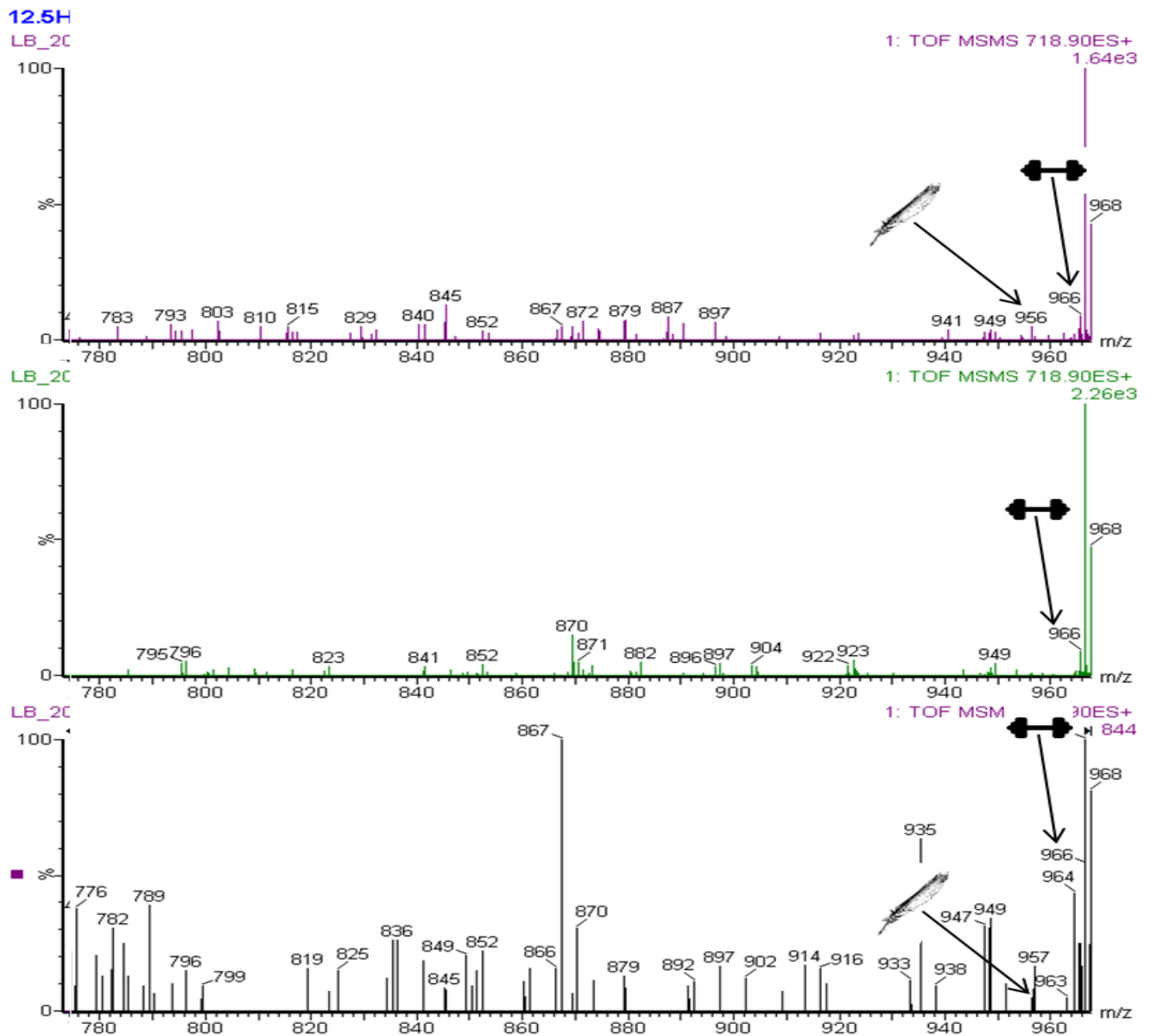


Abbildung 32: Spektrum des b-Ions IELD mit dem eingezeichneten schweren Peptid (HP beziehungsweise Hantel) und Normalpeptid (NP bzw Feder) im Wildtyp (lila), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (schwarz).

#### 4.4.10 Rekombinante CK2

Gleichzeitig mit den phänotypischen und molekularbiologischen Charakterisierung der *ck2*-Pflanzen wurde daran gearbeitet, eine rekombinante CK2 zu erhalten, um mit ihr *in-vitro*-Experimente in Bezug auf die Suche nach neuen Substraten durchzuführen. Um *in vitro* Experimente durchführen zu können, wurde die rekombinante CK2 überexprimiert. Der Vorteil des gewählten Plasmids pMALc5x (Amp<sup>+</sup>) Expressionsvektorsystems war der N-terminale *maltose binding protein*- (MBP)-tag am Protein, der eine schnelle Reinigung mit kommerziell erhältlichen Kits sowie eine Selektion mit Ampicillin ermöglichte. Die Klonierung des CK2-Fragments wurde ohne das Transitpeptid (s. Anhang) durchgeführt, da das Protein bakteriell überexprimiert

werden sollte und das Ziel war, das Protein in seiner aktiven Konformation, ohne das Transitpeptid zu erhalten. Diese aktive Konformation nimmt die CK2 erst am Ort seiner Bestimmung, nach der Passage durch die Membran ins Chloroplasteninnere an, wo dem Protein CK2 durch die Peptidase das Transitpeptid abgespalten wird. Dafür wurde zunächst eine PCR mit Primern (Kapitel 3.4) so durchgeführt, dass in das entstandene PCR Produkt die im Vektor vorhandenen Restriktionsschnittstellen NotI und BamHI eingebaut wurden. Anschließend erfolgte die Restriktion sowohl des PCR-Produktes als auch des Vektors (dieser wurde durch Phosphatase behandelt), wobei der Vektor an den beiden Schnittstellen geschnitten wurde. Nach der Auftragung der PCR-Produkte auf ein 1 %iges-Agarose-Gel wurden 2 Banden erhalten (der linialisierte Vektor und die CK2 ohne das Transitpeptid, jedoch mit den BamHI und NotI-Erkennungsstellen.) Der letzte Schritt war eine Ligation, bei der die beiden Produkte zu einem Plasmid vereint wurden (s. Abbildung 33).

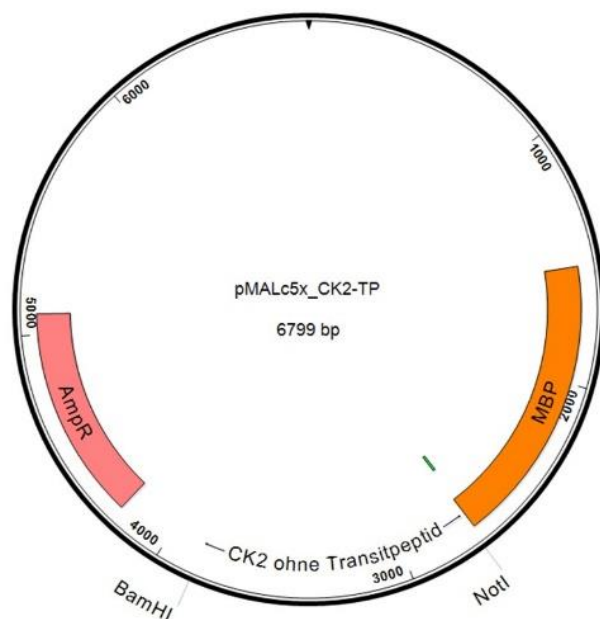


Abbildung 33: Klonierungsvektor mit der rekombinanten CK2 und den verwendeten Primern BamHI und NotI.

Der Ligationsansatz erfolgte unter der Verwendung von Vector: Insert- Verhältnis von 3,5:1 beziehungsweise 1:1, wobei 1-mal 30 ng an Vektor und ein zweites Mal 50 ng an Vektor zum Einsatz kamen. Nach der Kolonie-PCR wurde eine ausgewählte Kolonie zum Sequenzieren geschickt. Die korrekte Sequenz der ligierten CK2 wurde durch die Sequenzierung durch die Firma MWG Eurofins bestätigt (Ergebnisse siehe Anhang Abbildung 70 und Abbildung 71).

Die Zellyse und Reinigung erfolgte nach dem NEB pMALc5x Reinigungsprotokoll. Da jedoch nach der Elution immer noch Verunreinigungen vorhanden waren (Spur D,

## Ergebnisse

Abbildung 34), wurde ein zweiter Reinigungsschritt in Form von einer Gelfiltration mit Sephacryl S100 durchgeführt. Eine saubere Bande von ~85 kDa (rekombinante CK2 mit MBP-tag) war das Ergebnis. Der MBP-tag wurde nicht von der CK2 getrennt, da dieser laut durchgeführten Aktivitätsanalyse keinen Einfluß auf die Kinaseaktivität besitzt (Daten nicht gezeigt).

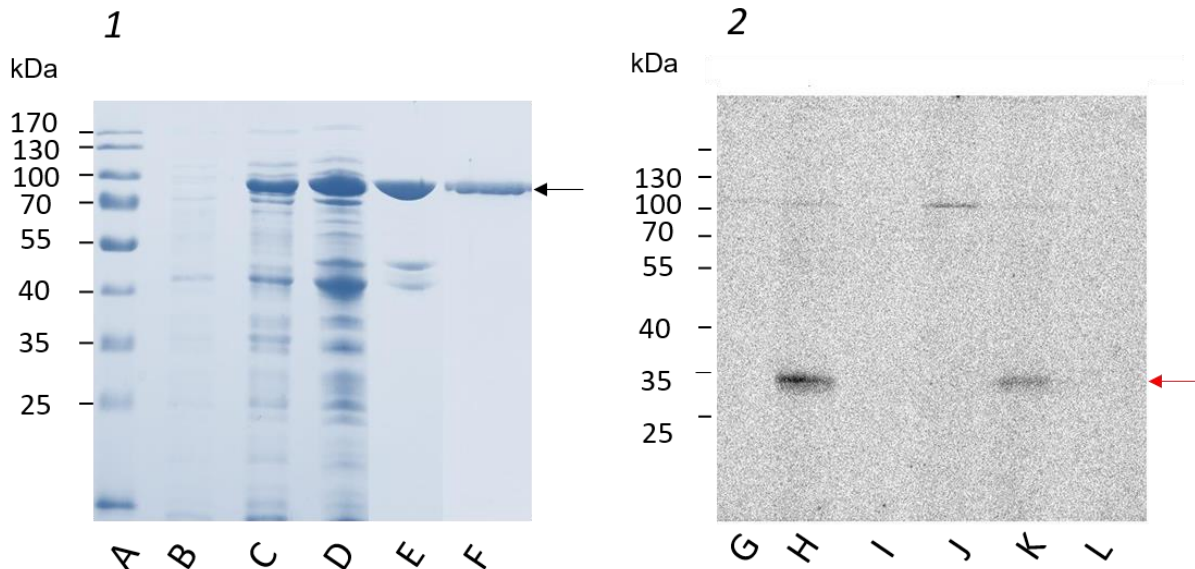


Abbildung 34: Teil 1: Überexpression und Reinigung der rekombinanten CK2. A = Marker. B vor der Induktion mit IPTG. C nach der Induktion mit IPTG. D auf die Amylose-säule aufgetragener Bakterienlysat. E Eluat von der Amylose Säule. F gereinigte MBP-CK2 (CK2 mit dem maltosebindendem Protein als tag) nach Gelfiltration, siehe mit dem schwarzen Pfeil markierte Bande. Teil 2: Ergebnisse des radioaktiven  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ -Aktivitätsassays in Gegenwart von G nur 0,5 µg rekombinante CK2, H-0,5 µg rekombinante CK2 mit 2 µg Casein als Substrat. I -Negativkontrolle mit 0,5 µg rekombinante CK2, 2 µg Casein und 1 mM GTP, J- Negativkontrolle mit 0,5 µg rekombinante CK2, 2 µg Casein und 15 µg/ml Heparin, K- Negativkontrolle mit 0,5 µg rekombinante CK2, 2 µg Casein und 1 mM ATP and L-10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Roter Pfeil markiert das positive Signal der Phosphorylierung des Casein mit  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ .

Die sauberen Fraktionen der rekombinanten CK2 aus der Gelfiltration wurden gesammelt und auf eine Konzentration von 1 mg / ml mittels Filtrationsröhrchens „Amicon Ultra 4“ der Firma Millipore aufkonzentriert. Die gereinigte rekombinante CK2 aus *Arabidopsis* wurde zuerst auf ihre katalytische Kinaseaktivität hin überprüft (Abbildung 34). Dazu wurde ein radioaktives Kinase-Assay mit  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  genutzt. Zur Bestimmung der Kinaseaktivität der rekombinanten CK2 wurde Casein als bekanntes Substrat zur Positivkontrolle hinzugezogen. Die in der Abbildung 34 Teil B Spur H abgebildeter Pfeil zeigt, das Casein phosphoryliert wurde. In der dritten Spur wurde zu der CK2 noch GTP hinzugegeben, von dem bekannt war, dass durch die duale Co-Substratspezifität, die CK2 auch GTP als Phosphogruppendonor nutzen kann. Da das GTP nicht radioaktiv markiert war, ist in dieser Spur kein Signal zustande

gekommen. Sowohl Heparin, als auch Ethylendiamintetraessigsäure sind Kinaseinhibitoren, daher wurde in diesen Spuren auch kein Signal detektiert. Durch ATP-Überschuß kommt es zur Inhibierung der Kinase, was das fehlende Ergebnis in der vorletzten Spur auch zeigt. Somit konnte eindeutig die katalytische Aktivität der rekombinant hergestellten Kinase gezeigt werden. Die nachfolgenden Kinase-Aktivitätsassays wurden mit den Pflanzenlysaten des WT- bzw. *ck2*-Linien aus dem Blattmaterial durchgeführt.

#### 4.4.11 Radioaktive Aktivitätsassays

Zunächst sollte der Phosphorylierungsgrad der Mutante festgestellt werden. Dazu wurden radioaktive Aktivitätsassays mit WT vs. *ck2*-Pflanzenlysaten mit mehreren Kontrollen und unter Zugabe der rekombinant hergestellten CK2 durchgeführt (Abbildung 35).

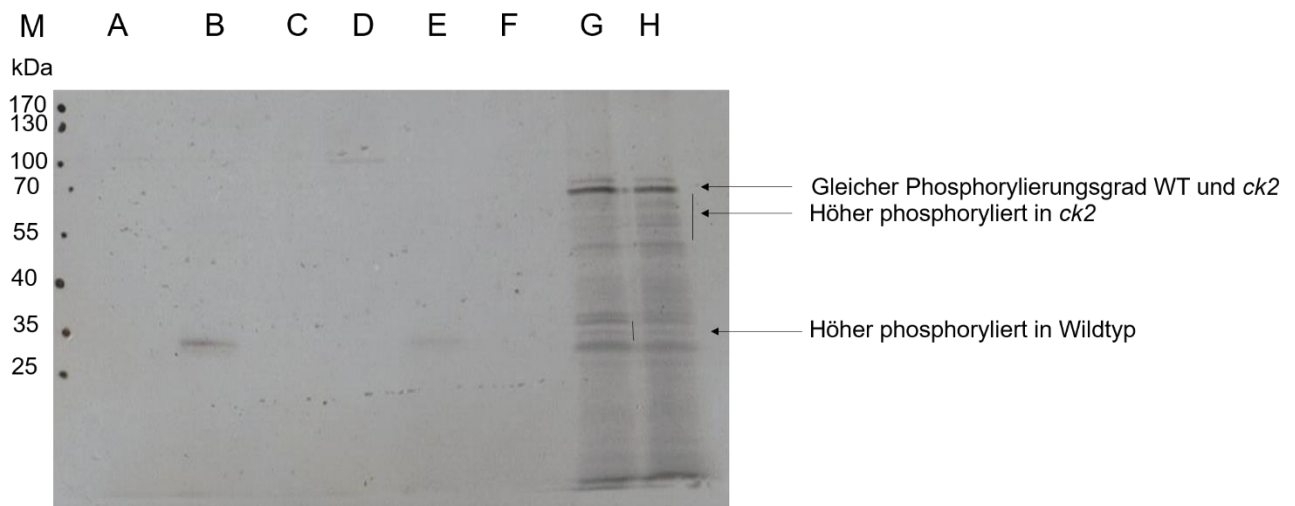


Abbildung 35: Autoradiogramm eines radioaktives 60 nM  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP Aktivitätsassays. M- Marker; in allen Ansätzen ist je 0,45  $\mu$ g gereinigte rekombinante CK2 erhalten. Zusätzlich kam hinzu: A-; B- 2  $\mu$ g dephosphorylierten  $\beta$ -Casein; C- 2  $\mu$ g dephosphorylierten  $\beta$ -Casein und 500  $\mu$ M nicht radioaktives GTP; D- 2  $\mu$ g dephosphorylierten  $\beta$ -Casein und 15  $\mu$ g/ml Heparin; E- 2  $\mu$ g dephosphorylierten  $\beta$ -Casein und 2 mM kaltes ATP; F- 2  $\mu$ g dephosphorylierten  $\beta$ -Casein und 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure; G- Wildtyp-Lysat (20  $\mu$ g Chlorophyll); H- *ck2*-Lysat (20  $\mu$ g Chlorophyll).

Der Kinaseaktivitätstest erfolgte mit den Chloroplastenlysaten des Wildtyps und *ck2*-Mutante von *Arabidopsis thaliana*. In Spur A war keine Bande erkennbar, was zeigte, dass die Casein Kinase 2 nicht autophosphoryliert wurde. In Spur B erkennbare Bande in Höhe von  $\sim$  35 kDa zeigte phosphoryliertes  $\beta$ -Casein (Positivkontrolle). Negativkontrollen mit ATP-, GTP-Überschuß, sowie Heparin- und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Zugabe zeigten, dass die gemessenen Aktivitäten einer Kinaseaktivität entsprechen (Spuren C und E). Duale Co-

Substratspezifität in Bezug auf ATP und GTP zeigte, dass beim Überschuss an nicht radioaktivmarkierten GTP dieser genauso für die Phosphorylierung des  $\beta$ -Caseins verwendet wurde wie  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP (fehlende Bande in der Spur C). In den Reaktionen mit Inhibitoren, wie EDTA und Heparin, fehlte ebenfalls die Phosphorylierung des  $\beta$ -Caseins (Spuren D und F). Phosphorylierung des Wildtyps und des Mutantelysates mit der rekombinanten CK2 zeigen unterschiedliche Muster. Die stärkeren Phosphorylierungsbandenmuster von GK615F11-Linien mit der rekombinanten CK2 zeigen, dass es sich bei der Linie um Pflanzen handelt, bei denen die Phosphorylierungseffizienz erhöht war.

#### 4.4.12 CHIP

Die Identifikation weiterer cpCK2 Substrate wäre der erste wichtige Schritt, um die Funktion dieser Kinase zu verstehen. Zu diesen Zwecken wurde in Zusammenarbeit mit der AG Schutkowski ein Phosphopeptide *microarray* ChloroPhos1.0 erarbeitet (Schoenberg *et al.*, 2014). Er wurde eigens für die Analyse der chloroplastidären Proteinkinasen unter Verwendung der plastidären Phosphoproteomedaten für Peptidselektion und die Position der Phosphorylierungsstellen entwickelt (Zulawski *et al.*, 2013). Die *in-vitro*-Identifikation der Kinase-Substrate basierte auf der Phosphorylierungsaktivität der gereinigten Kinase oder des Extraktes der Wildtyp-Pflanzenlinie auf Peptide oder Proteine. Wenn die Substratsuche im großen Maßstab erfolgen soll, werden Kinasesubstrate über Peptid- oder Proteinarrays gesucht. Der Proteinarray war dem Standard-Kinase-Assay mit  $\gamma$ -<sup>32/33</sup>P-ATP ähnlich. Das  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP wurde als Substrat genutzt und der Phosphattransfer auf mehrere potentielle Substratproteine parallel beobachtet (Feilner *et al.*, 2005). Peptidarrays waren gegenüber den Proteinarrays sehr ähnlich, außer, dass synthetische Peptide mit einer Länge von 12-18 Aminosäuren als Kinasesubstrate genutzt werden und keine Proteine. Um sicher zu gehen, dass nur echte *in-vivo* Kinase-Substrate als potentielle Substrate auf dem Chip mobilisiert wurden, wurden nur solche Peptide ausgewählt, die bereits vorher in Phosphoproteom Experimenten als Phosphopeptide identifiziert wurden. Die Analysen zeigten, dass „ChloroPhos1.0“ ein gut anwendbares Werkzeug war, die bisher unbekannt Kinase-Substrat Beziehungen im Chloroplast-Phosphoproteomenetzwerk zu untersuchen. Der Chip ermöglichte das Herausfiltern der bevorzugten Phosphorylierungsmotive der chloroplastidären Kinase und erleichterte die Vorhersage möglicher Substrate, die über Massenspektrometrie nicht detektierbar waren. Die auf dem Chip verwendeten Kinasen waren die rekombinante

## Ergebnisse

cpCK2 und die über Heparin-Sepharose angereicherte CK2 aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* (Schoenberg *et al.*, 2014). Insgesamt 905 Peptide wurden als 15-mere in neun Replikaten auf Objektträger aufgetragen. Die komplette Liste der auf dem Chip mobilisierter Peptide wurde in der Tabelle 36 zusammengefasst.

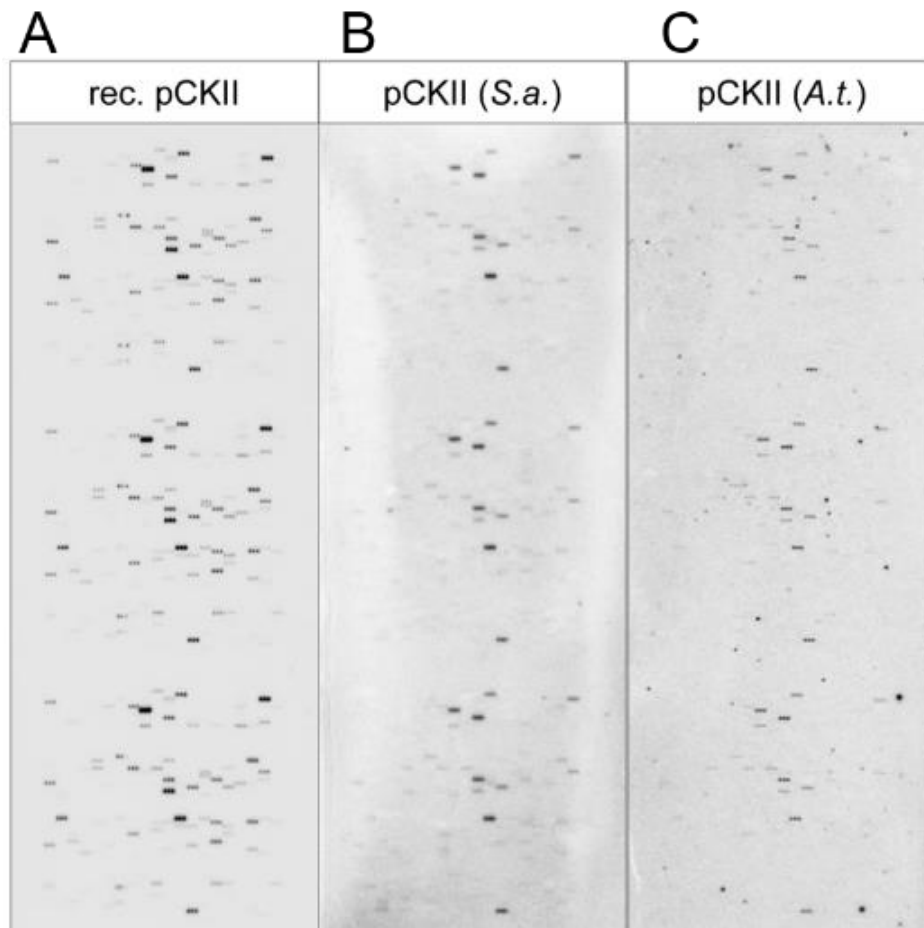


Abbildung 36: Mit unterschiedlichen Präparationen erhaltene Ergebnisse der Peptidchips. A, rekombinante pCKII; B, über Heparin-Sepharose angereicherte CK2 aus *Sinapis alba*, C, über Heparin-Sepharose angereicherte CK2 aus *Arabidopsis thaliana*. Aus Schoenberg *et al.*, 2014.

Tabelle 20 zeigt eine Auswahl der Kandidaten, bei denen angenommen wurde, diese würden als Substrate der CK2 in Frage kommen. Auch wurde in der Tabelle dargestellt welche Peptide in wie vielen Replikaten phosphoryliert gefunden werden konnten.

Ergebnisse

Tabelle 20: Ergebnisse der Chip-Auswertung der phosphorylierten Peptide, dazugehörigen ATG-Nummern und Beschreibung und in wie vielen Replikaten und mit welcher Probe die Peptide gefunden wurden. Die Durchführung des Experiments erfolgte zusammen mit Anna Schönberg. Die Auswertung der Daten wurde von Anna Schönberg durchgeführt. Aus Schoenberg et al., 2014.

Peptidsequenz	ATG-Nummer	Beschreibung	Phosphoryliert in		
			recombinant pCKII	native enzyme	
				Hep Sep h-A.t.	Hep Sep h-S.a.
AFKSLGLSDHDEYDL	AT5G26742.1	<i>emb1138   DEAD box RNA</i>	3	1	1
	AT5G26742.2	<i>emb1138   DEAD box RNA</i>			
DASEGDVSEGDESEG	AT4G24770.1	<i>RBP31, ATRBP31, CP31,</i>	2	1	1
DEEEGNVSDRGDEDE	AT4G12610.1	<i>RAP74, ATRAP74</i>	1	1	0
	AT4G12610.2	<i>RAP74, ATRAP74</i>			
DNEVEPVTDDNDRA	AT5G19390.4	<i>Rho GTPase activation</i>	1	0	0
	AT5G19390.3	<i>Rho GTPase activation</i>			
	AT5G19390.1	<i>Rho GTPase activation</i>			
	AT5G19390.2	<i>Rho GTPase activation</i>			
DNGGDVIDADFTDSN	AT5G49910.1	<i>CPHSC70-2EAT SHOCK</i>	1	1	0
DVSEGDESEGDVSEG	AT4G24770.1	<i>RBP31, ATRBP31, CP31,</i>	1	0	0
FFEGGFGSDDDPSTSP	AT1G64510.1	<i>Translation elongation factor</i>	3	2	1
FVGGEETKSGGEEAE	AT5G53170.1	<i>FTSH11</i>	1	0	0
GDGTSDSDSDPDPK	AT3G09050.1	<i>unknown protein</i>	2	0	0
GFNRLDDSAEFFTSD	AT2G36390.1	<i>SBE2.1, BE3</i>	1	0	0
GKKLSELSDDDFDE	AT3G48500.1	<i>PDE312, PTAC10</i>	2	2	2
	AT3G48500.2	<i>PDE312, PTAC10</i>			
GLSDHDEYDLGDNN	AT5G26742.1	<i>emb1138   DEAD box RNA</i>	2	0	0
	AT5G26742.2	<i>emb1138   DEAD box RNA</i>			
GSDKGILSDVELLKE	AT5G13630.1	<i>GUN5, CCH, CHLH, CCH1,</i>	1	0	0
	AT5G13630.2	<i>GUN5, CCH, CHLH, CCH1,</i>			
GSESEEEETEEMIFGS	AT4G02510.1	<i>TOC159, TOC86, PPI2,</i>	3	2	2
IDGQIVTDSDEDVDT	AT4G02510.1	<i>TOC159, TOC86, PPI2,</i>	1	1	0
KAEKDEVSDEATIE	AT1G58200.1	<i>MSL3</i>	1	2	0
	AT1G58200.2	<i>MSL3</i>			
KDDDEDDQSSDGHED	AT3G52230.1	<i>unknown protein</i>	1	0	0
KGFVADDSDIESPRD	AT5G19390.2	<i>Rho GTPase activation</i>	1	0	0
	AT5G19390.1	<i>Rho GTPase activation</i>			

Ergebnisse

	AT5G19390.4	Rho GTPase activation			
	AT5G19390.3	Rho GTPase activation			
KYEGKKLSELSDDDED	AT3G48500.1	PDE312, PTAC10	2	3	2
	AT3G48500.2	PDE312, PTAC10			
LSEEFKSLGLSDHD	AT5G26742.1	emb1138   DEAD box RNA	2	0	0
	AT5G26742.2	emb1138   DEAD box RNA			
LSKSGDGTSDSDSDP	AT3G09050.1	unknown protein	2	0	0
LSYLPDLSDVELAKE	AT5G38420.1	Ribulose bisphosphate	2	0	0
	AT5G38410.2	Ribulose bisphosphate			
	AT5G38410.1	Ribulose bisphosphate			
	AT5G38410.3	Ribulose bisphosphate			
NSSVEEETEEVEED	AT5G08540.1	unknown protein	1	0	0
PDFKIRATDIDDEWG	AT4G04020.1	FIB	1	0	0
PFDSDESNDKHTLN	AT5G61210.1	SNAP33, ATSNAP33,	3	2	2
QSESEEGSDDEEEEA	AT2G28800.4	ALB3	2	2	2
	AT2G28800.1	ALB3			
RGLAYDTSDDQQDIT	AT2G39730.1	RCA	1	0	0
	AT2G39730.2	RCA			
	AT2G39730.3	RCA			
RWRGLAYDTSDDQQD	AT2G39730.1	RCA	1	1	0
	AT2G39730.2	RCA			
	AT2G39730.3	RCA			
SKPNPFDSDESNDK	AT5G61210.1	SNAP33, ATSNAP33,	2	2	1
TDEWGEKSGPELEES	AT2G35490.1	Plastid-lipid associated	1	0	0
VEESQSESEEGSDDE	AT2G28800.4	ALB3	2	2	1
	AT2G28800.1	ALB3			
VLAESSESAFEDQCG	AT5G14740.5	CA2, CA18, BETA CA2	1	0	0
	AT5G14740.3	CA2, CA18, BETA CA2			
	AT5G14740.4	CA2, CA18, BETA CA2			
	AT5G14740.1	CA2, CA18, BETA CA2			
	AT5G14740.2	CA2, CA18, BETA CA2			
VTRVDGSESEETEE	AT4G02510.1	TOC159, TOC86, PPI2,	1	1	0



Die Substrate der rekombinanten pCK2 waren zum Beispiel Peptide des Translationselongationsfaktors EF1B, Alb3, Toc 159, TAC10 und RH3. Die rekombinante plastidäre CK2 hatte viele weitere Peptide als einmalige Substrate, ribonucleäres- Protein-31 (RNP 31), metabolische Enzyme, zum Beispiel Rubisco-Aktivase und  $Mg^{2+}$ -Chelatase. Die von rekombinanter plastidärer CK2 phosphorylierten Substrate waren weniger sauer als die von *in-vivo*-CK2.

Einige Peptide wurden exklusiv von der rekombinanten plastidären CK2 phosphoryliert, was mehr oder weniger eine Konsequenz der höheren spezifischen Kinaseaktivität ist (*Abbildung 20*). Es wurde angenommen, dass die Peptide, die sowohl durch rekombinante und durch Heparinsepharose angereicherte CK2 phosphoryliert werden weniger CK2-Aktivität benötigen um ein detektierbares Phosphorylierungssignal zu erzeugen. Diese Peptide enthielten dieselbe Anzahl S, T oder Y Phosphorylierungsstellen wie die, die ausschließlich durch die rekombinante CK2 phosphoryliert wurden, diese waren jedoch saurer und das Phosphorylierungsmotiv stimmte mit der CK2-Konsensussequenz in Positionen +1 bis +3 relativ zur Phosphorylierungsstelle überein. Die Peptide, die ausschließlich durch das rekombinante Enzym phosphoryliert wurden, waren höchstwahrscheinlich weniger bevorzugte CK2-Substrate. Durch den Chip ermittelten potentiellen Substrate der CK2 sollten natürlich durch ergänzende Methoden verifiziert und im Idealfall als Substrat bestätigt werden. Zunächst wurde eine nicht gerichtete Phosphoproteome Analyse (*untargeted*) durchgeführt.

#### **4.5 Ungerichtete Phosphoproteomics**

Alle Originaldaten befinden sich im *supplement* Ordner „ungerichtete Phosphoproteomics“. Proteomics sind eine der wichtigsten Quellen an Informationen über die biologischen Systeme, da diese Erkenntnisse über Konzentrationen, Interaktionen, Funktionen und katalytischen Aktivitäten von Proteinen generierten, die die strukturellen und funktionellen Hauptakteure in der Zelle sind (Baginsky *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung, trotz seiner Allgegenwärtigkeit, auf ein Einzelereignis gerechnet, ist ein seltenes Ereignis, daher ist es sehr schwierig den Phosphorylierungsstatus einer unangereicherten Probe zu bestimmen. Eine geeignete Methode ist die phosphorylierten Proteine beziehungsweise Peptide anzureichern. Eine Möglichkeit diese Proteine anzureichern stellt die Titandioxid-Anreicherungsverfahren dar, dabei werden saure Peptide ebenso wie die negativ geladene Phosphopeptide angereichert.

#### 4.5.1 Validierung der Titandioxid-Anreicherung von Phosphoproteinen aus *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und *ck2*-Linien.

##### 4.5.1.1 Blatt

Als erstes wurde die Anzahl der Proteine im Wildtyp und der *ck2* vor und nach der Anreicherung verglichen. Ziel der Anreicherung war es, die Komplexität der Probe zu senken, da nur die phosphorylierten Proteine angereichert wurden. Die Anreicherung war erfolgreich und die Komplexität der Probe gesunken (Abbildung 37).

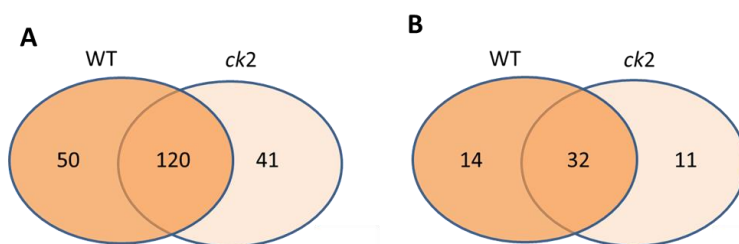


Abbildung 37: Anzahl der mit der „LTQ“ gefundenen Proteine im Wildtyp- (WT) und *ck2*-Linien vor (A) und nach (B) der Titandioxidanreicherung, in min. 2 biologischen Replikaten.

Die LTQ XL Messungen dienten in erster Linie der Qualitätskontrolle der Anreicherung. Für die vollständige Phosphotroteomics-Analyse wurden die Proben mit der LTQ Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific) vermessen.

##### 4.5.1.2 Wurzel

Wie im Blatt musste auch in der Wurzel der Erfolg der Anreicherung bestimmt werden. Als erstes wurde die Anzahl der Proteine im Wildtyp und der *ck2*-Linie vor und nach der Anreicherung verglichen. Ziel der Anreicherung war es wie oben, die Komplexität der Probe zu senken, da nur die phosphorylierten Proteine angereichert werden sollten. Die Anreicherung war erfolgreich und die Komplexität der Probe gesunken (Abbildung 38).



Abbildung 38: Anzahl der mit der LTQ gefundenen Proteine der Wurzel vor (A) und nach (B) der Titandioxidanreicherung, in min. 2 biologischen Replikaten.

Die „LTQ-XL“-Messungen dienen in erster Linie der Qualitätskontrolle der Anreicherung.

## 4.6 Analyse der mittels Velos ermittelten MS-Daten

Viele Phosphoproteomics Studien wurden aufgrund der Genauigkeit der Messinstrumente und der Verlässlichkeit der Software, die die Lokalisation der Proteine voraussagten, mit Gesamtzellextrakten durchgeführt. Dadurch erhielt man selbstverständlich eine große Menge an Informationen, wobei zum Teil Phosphoproteine, die nur wenig abundant waren, nicht erfasst werden. Deshalb wurden die *untargeted* Messungen auf Wurzel und Blatt beschränkt. Erstaunlicherweise wurden in der phosphorylierungsdefizienten Mutante *ck2* mehr phosphorylierte Peptide detektiert als im WT. Zum Erhalt einer kompletten Übersicht über den veränderten Phosphorylierungsstatus der Mutante und diesen zu evaluieren, wurde zu der HDMS<sup>F</sup>-Methode gegriffen. Es wurde ein sehr großer Pool an Daten (elektronischer Anhang) gewonnen, die nun geordnet ausgewertet werden sollten.

### 4.6.1 Phosphoproteomics im Blatt

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „MaxQuant“. Der Abgleich der in der Literatur beschriebenen phosphorylierten Peptide erfolgte mit Hilfestellung des Programms „PhosPhAt 4.0“. Es wurden im Wildtyp mit einer FDR von <5% mittels beider Methoden *collision induced dissociation* CID und *multi-stage activation* MSA insgesamt 719 phosphorylierte Peptide gefunden. In der Mutante 722 detektierten Phosphopeptiden. Es wurde also eine etwa gleiche Anzahl an Phosphopeptiden detektiert. Es war auffällig, dass bei der gleichen Handhabung der Proben, die Mutante einen höheren Anteil an einmaligen Phosphopeptiden aufwies. Die vergleichende Umrechnung der Signalintensitäten erhaltener Phosphopeptide wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden die Gesamtintensitäten aller ermittelten Phosphopeptide in der Wildtyp-, *ck2*-Linien ermittelt. Die Gesamtintensität der jeweiligen Linie wurde durch addieren der Signale aller Phosphopeptide errechnet. Anschließend wurde die Summe alle gefundenen Signale eines Phosphopeptids in der jeweiligen Linie addiert mit  $10^6$  multipliziert und das Ergebnis durch die ermittelte jeweilige Gesamtintensität der Linie dividiert, somit ergab sich der Anteil des Phosphopeptids an der Gesamtintensität als *parts per million* (ppm). Sowohl in Wildtyp- als auch in der *ck2*-Linien wurde große Anzahl von phosphorylierten Proteinen detektiert. Zu den am häufigsten vorkommenden zählten die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/Oxygenase (Rubisco, ATCG00490, EC.4.1.1.39 ), ein Hitzeschockprotein (AT5G49910), verschiedene Untereinheiten der ATP-Synthase (AT4G09650, ATCG00480) und die Rubisco-Aktivase (ATCG00480). Von großem

Interesse und als mögliche Substrate der CK2 wurden vor allem diejenige Phosphoproteine gehandelt, die ausschließlich in den WT-Proben vorkamen. Diese wurden in Tabelle 21 zusammengefasst.

*Tabelle 21: Phosphopeptide, die ausschließlich in Blättern von 2 Wochen alten Wildtyppflanzen nachgewiesen wurden. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. In Farbe Ocker hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.*

ATG-Nummer	Protein	CID	MSA	MAP Man Bin	Beschreibung
AT1G06190	Rho Terminationsfaktor	■□■	■□■	35.2	interagiert mit RNase E
AT1G32070	Serotonin N-Acyltransferase	□□■	□■□	26.24	GCN5-related N-acetyltransferase
AT1G74470	Pyridin-Nucleotid-Disulphid-Oxidoreductase	□■□	□□□	16.01.2001	Sekundärmetabolismus
AT2G20920	Chaperon (DUF3353)	□□□	■□□	35.2	unbekannt
<i>AT2G38040</i>	<i>Acetyl Co-enzyme A carboxylase <math>\alpha</math>-UE</i>	□□■	□□■	<i>11.1.1.2.1</i>	<i>Lipidmetabolismus</i>
AT3G03710	Nucleotidyltransferase	■■□	□■□	27.1	RNA.processing
AT3G09050	8-amino-7-oxononanoate synthase	□□■	□□■	35.2	unbekannt
AT3G18890	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	□□□	□■□	30.11	Lichtsignaltransduktion
AT3G49140	Pentatricopeptide repeat	□■□	□□□	35.1.5	(PPR) repeat-containing protein
AT3G63140	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	□■□	□□□	27.3.99	RNA-Regulation der Transkription
<i>AT4G02510</i>	<i>TOC 159</i>	□□■	□□■	29.3.3	<i>protein.targeting.chloroplast</i>
AT4G26670	Tim17/Tim22/Tim23 family protein	□□■	□□□	29.3.2	protein.targeting.mitochondria
AT5G01750	LURP-one-like protein (DUF567)	□□□	□□■	35.2	unbekannt
AT5G02940	ion channel POLLUX-like protein (DUF1012)	■□□	□□□	35.2	unbekannt
AT5G14460	Pseudouridine synthase family protein	□■□	□□□	23.5.2	Nukleotidmetabolismus
AT5G17520	root cap 1 (RCP1)	□□■	□□□	2.2.2.6	Stärketransporter
AT5G25980	glucoside glucohydrolase 2	□■□	□□□	16.5.1.3.1.1	Sekundärmetabolismus
AT5G52960	tRNA dimethylallyltransferase	□□■	□□□	35.2	Transferase
AT5G54270	light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	□□□	□■□	1.1.1.1	LHCII
AT5G65220	Ribosomal L29 family protein	□■■	□■■	29.2.1.1.1.2.29	Proteinsynthese

Insgesamt 20 Phosphopeptide wurden ausschließlich im Wildtyp detektiert (Tabelle 21). Von vier Proteinen war die Funktion unbekannt (AT2G20920, AT3G09050, AT5G01750, AT5G02940). Insgesamt vier Phosphopeptide waren Bestandteile der Proteine des Metabolismus (AT1G74470 und AT5G25980 im Sekundärmetabolismus, AT2G38040 im Lipidmetabolismus und AT5G14460 im Nukleotidmetabolismus). Zwei der Phosphopeptide hatten ihre Funktion im *targeting* (AT4G02510 und AT4G26670). Zwei waren an der RNA-Regulation beteiligt (AT3G0370 und AT3G63140). Es konnten im Wildtyp zwei Phosphopeptide der Proteine detektiert werden, dessen Gene mit CK2 coexprimiert wurden. Diese waren AT2G38040, eine Acetyl-CoA-Carboxylase, ein Enzym des Lipidmetabolismus und *translocase of chloroplast 159* (TOC 159) (AT4G02510), für das Protein-*targeting* in den Chloroplasten zuständig war. Die

Koexpression wurde mittels „Genevestigator“ ermittelt (<https://genevestigator.com/gv/>).

Die Phosphopeptide wurden als mögliche Substrate angesehen sobald folgende Kriterien erfüllt waren:

- SUBA Abfrage ergab plastidäre Lokalisation
- Peptid liegt phosphoryliert vor
- Saure Konsensussequenz ist vorhanden

Von den 20 ausschließlich in Wildtypproben detektierten Phosphopeptiden wurden 9 als gute Kandidaten eingestuft um als Substrat der CK2 fungieren zu können (Tabelle 22). Diese Phosphopeptide besaßen die typische CK2-Konsensussequenz, S/T (Phosphorylierungsstelle am Serin oder Threonin) XX (beliebige Aminosäuren) D/E (saure Aminosäuren), die für die Phosphorylierung durch die CK2 nötig war.

*Tabelle 22: Proteine, die aufgrund der Konsensussequenz ihres ausschließlich in WT-Proben gefundenen Phosphopeptids als potentielle CK2 Substrate in Frage kommen.*

<b>Protein</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Phosphopeptid</b>
AT1G32070.1	N-Acyltransferase	sSSDSDSSEGGDGEKQQEK
AT2G20920.1	Chaperon (DUF3353)	DDPNAIsQAEAAyDM <sub>(ox)</sub> LLM <sub>(ox)</sub> QSLNQR
AT3G03710.1	Nucleotidyltransferase	ALLPEsETDKDSQK
AT3G49140.1	Pentatricopeptide repeat	AGGDEsEIDSSQDEK
AT4G02510.1	TOC159	ASsGIEAHSDEANISNM <sub>(ox)</sub> SDR
AT5G14460.1	Pseudouridinsynthase	LYGsDSEDENSSR
AT5G17520.1	<i>Root cap 1</i> (RCP1)	SINSEsDSDSDFPHENQQGNPGLGK
AT5G52960.1	tRNA dimethylallyltransferase	SSDAEEVsDTEDEWLK
AT1G32070.2	Serotonin N-Acyltransferase	SSsDSDSSEGGDGEKQQEK

Weiterführende zielgerichtete Phosphoproteom-Analysen waren nötig um diese Frage hinreichend zu evaluieren.

Ebenfalls von Interesse waren die ausschließlich in den GK615F11-Proben phosphorylierte Peptide. Diese Tatsache könnte damit zu tun haben, dass

möglicherweise aufgrund des *knock-downs* des CK2-Gens noch weniger CK2 exprimiert wurde, dadurch konnte die ohnehin schon gering vorkommende Kinase, nicht mit allen direkte und indirekte Interaktionspartnern interagieren, die Phosphorylierungsstellen bleiben unbesetzt. Durch die fehlende Regulation durch die CK2 wurden weitere Proteine phosphoryliert, die keine nativen CK2-Substrate darstellten. Ebenfalls plausibel war die Annahme, dass die durch fehlende CK2 andere alternative, weniger spezifische Kinasen, auch Substrate ohne die typische saure Erkennungssequenz phosphorylierten.

*Tabelle 23: In Blättern vom 2 Wochen alten, ausschließlich ck2-Pflanzen gefundenen Phosphopeptide. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. Farblich hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.*

ATG-Nummer	Protein	Sequenz	CID	MSA	MapM:	Beschreibung
AT1G03160	FZO-like	TIQNLSAGtTSK	■ ■ □ □ □ □	30.5		signalling G-Proteine
AT1G03475	Coproporphyrinogen III oxidase	DSDDVtPSSSSSVR	■ ■ □ □ □ □	19.8		Tetrapyrrolynsynthese
AT1G14810	semialdehyde dehydrogenase family protein	GTIVVDNsAFR	■ ■ □ □ □ □	13.1.3.ε	AS	Metabolismus
AT1G16880	ACT- Domäne enthaltendes Protein	ANVYLDsSGKHNK	■ □ □ □ □ □	35.1		Antworten auf Kälte, Zytokinin, Lichtänderung
AT1G17220	Translation initiation factor 2, small GTP-binding protein	DGDDsEVVLKQTPK	■ ■ □ □ □ □	29.2.3		Proteinsynthese Initiation
AT1G31330	photosystem I subunit F	KLEsSLK	■ ■ □ □ □ □	1.1.2.2		PSI
AT1G32160	beta Casein (DUF760)	LYAAsAM(ox)YGYFLRR	■ □ □ □ □ □	35.2		keine Zuordnung
AT1G74070	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	ssLLLLLtQtLlPLDfSK	■ ■ □ □ □ □	31.3.1		Zellzyklus
AT2G03140	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	ALSM(ox)VTYGCEsIEDFysSCATR	■ ■ □ □ □ □	33.99		Entwicklung
AT2G20260	photosystem I subunit E-2	AAEDTPPATAsSDSSSTTAAAPAK	■ ■ ■ ■ ■ ■	1.1.2.2		PSI
AT2G21330	fructose-bisphosphate aldolase 1	TIAspGHIM(ox)AM(ox)DESNAATCGK	□ □ □ ■ ■ ■	1.3.6		PS.calvin cycle.aldolase
AT2G34420	photosystem II light harvesting complex gene B1B2	GPLENLADHLADPVNNNAWAFAtNFVPGK	■ ■ ■ ■ ■ ■	1.1.1.1		LHCII
AT2G34430	LHCII subunit B1	ASKPtGSPGSPWYGSDR	■ □ ■ ■ ■ ■	1.1.1.1		LHCII
AT2G34640	plastid transcriptionally active 12	AsiStTWLyR	■ ■ □ □ □ □	27.3		RNA.regulation of transcription
AT2G35410	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	SPNDLPsPAPGDTR	■ ■ □ □ □ □	27.4		RNA Bindung
AT2G40400	unbekannt	ssSLNM(ox)NPLTQIVPFGPSSyLSAQAR	■ ■ □ □ □ □	35.2		Chloroplastentwicklung involviert
AT3G12780	phosphoglycerate kinase 1	SVGDLTsADLK	■ ■ □ □ □ □	1.3.3		Calvin Zyklus
AT3G14420	Aldolase-type TIM barrel family protein	AIALTVdtPR	■ □ □ □ □ □	1.2.2		Zellatmung
AT3G22690	Protein unbekannter Funktion	NsGIEVNDLM(ox)VSAVLDM(ox)yM(ox)K	■ ■ ■ ■ ■ ■	35.1.5		keine Zuordnung
AT3G26070	Plastid-lipid associated protein PAP	GATAsPDDQLR	□ □ □ ■ □ □	31.1		Zellorganisation
AT3G50820	photosystem II subunit O-2	NTAAsVGEITLK	■ ■ □ □ □ □	1.1.1.2		PSII
AT3G52960	Thioredoxin superfamily protein	sFAAttPVtAsISVGDk	□ □ □ ■ ■ ■	21.5		redox.peroxidoredoxin
AT4G02770	photosystem I subunit D-1	EAPVGFTPPQLDPNTPSPiFAGsTGGLLR	□ □ □ ■ ■ ■	1.1.2.2		PSI
AT4G08390	stromal ascorbate peroxidase	VDasGPEDCPEEGRPLDAGPPsPATHLR	■ ■ ■ □ □ □	21.2.1		redox.ascorbate and glutathione.ascorbate
AT4G09010	ascorbate peroxidase 4	GGVSFLStVPSFtNTtNHQLTLtLSSsHR	■ ■ □ □ □ □	21.2.1		redox.ascorbate and glutathione.ascorbate
AT4G20360	RAB GTPase homolog E1B	SYtVTGVEM(ox)FQK	■ ■ □ □ □ □	29.2.4		Proteinsynthese
AT4G22240	Plastid-lipid associated protein PAP	FAGPLGtNSISTNAK	■ □ □ □ □ □	31.1		Zellorganisation
AT4G32260	ATPase, F0 complex, subunit B/B'	ALDsQIAALSEDIVK	■ □ □ □ □ □	1.1.4.9		Lichtreaktion
AT5G04140	glutamate synthase 1	YSTNTsPR	□ □ □ ■ ■ ■	12.2.1.1N		metabolismus
AT5G10490	MSCS-like 2	M(ox)yTETDVENTPFGESM(ox)YGGVtsR	□ □ □ ■ ■ ■	31.2.5		Zellteilung plastidär
AT5G14740	carbonic anhydrase 2	ITAELQAASsSDSK	■ ■ ■ ■ ■ ■	8.3		TCA
AT5G23890	unbekannt	SPVPESTDGSKDELNIySsQDELDDNR	□ □ □ ■ ■ ■	35.1		keine Zuordnung
AT5G26570	catalytic;carbohydrate kinases	LEASpSHVNIILSTEGR	□ □ □ ■ ■ ■	2.2.2.3		CHO Metabolismus
AT5G38520	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	PTILIGNSVGsLACVIAAsEsR	□ □ □ ■ ■ ■	35.1		keine Zuordnung
AT5G65620	Zincin-like metalloproteases family protein	LLGyNNyAEVSM(ox)AMK	□ □ □ ■ ■ ■	29.5		Proteinabbau
ATCG00120	ATP synthase subunit alpha	TNKPQEQIEIAsTK	■ ■ ■ ■ ■ ■	1.1.4.1		Lichtreaktion

In den Proben der *ck2*-Mutante wurden insgesamt 36 von der Wildtypprobe verschiedenen Phosphopeptide detektiert, die Phosphoproteinen zugeordnet werden konnten (Tabelle 23). Von einigen waren keine Funktion bekannt (AT1G32160, AT3G22690, AT5G23890, AT5G38520) dabei. Sechs Phosphopeptide waren Bestandteile von Proteinen der Photosynthese (AT1G31330, AT2G20260, AT2G34420, AT2G34430, AT3G50820, AT4G02770). Es konnten einige Phosphopeptide der Proteine des Calvin Zyklus, des Tricarbonsäurezyklus und an der

Zellatmung beteiligter Proteinen detektiert werden. Zwei Peroxidasen wurden in phosphorylierter Form gefunden (AT4G08390, AT4G09010), was darauf hinwies, dass die Mutante definitiv unter Stress steht. Auch einige Phosphopeptide von Proteinen der RNA-Regulation, der Proteinbiosynthese und –abbaus konnten gefunden werden. Alle nachgewiesenen Phosphopeptide waren in der Literatur bereits als Phosphopeptide beschrieben. Einige, ausschließlich in *ck2*-Proben gefundenen Phosphopeptide würden aufgrund der auf Seite 102 beschriebenen Kriterien als CK2 Substrate in Frage kommen.

*Tabelle 24: Proteine, die aufgrund der Konsensussequenz ihres, ausschließlich in ck2-Proben gefundenen Phosphopeptids als potentielle ck2 Substrate in Frage kommen*

Protein	Beschreibung	Phosphopeptid
AT2G03140	$\alpha/\beta$ -Hydrolase Superfamilie Protein	ALSM <sub>(ox)</sub> VTYGCEsIEDFYSSCATR
AT3G22690	Protein unbekannter Funktion	NsGIEVNDLM <sub>(ox)</sub> VSALVDM <sub>(ox)</sub> YM <sub>(ox)</sub> K
AT3G26070	Plastid-Lipid assoziiertes Protein	GATAsPDDQLR
AT3G50820	Photosystem II Untereinheit O-2	NTAAsVGEITLK
AT5G23890	unbekannt	SPVPESTDGSKDELNIYsQDELDDNR

Die meisten Peptide jedoch, die identifiziert wurden, kamen sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp gleichermaßen detektiert werden. Jedoch die alleinigen Tatsache ihres Vorhandenseins, lässt nicht den Schluss auf die Intensität zu. Die phosphorylierungsdefiziente *ck2* weist einen höheren Phosphorylierungsgrad als der Wildtyp auf. Dieser vermeintliche Widerspruch wurde bereits in den Kinaseaktivitätsexperimenten beobachtet. Es wurden in den GK615F11-Blättern weitaus mehr phosphorylierte Peptide detektiert als im Wildtyp. Die Herabsetzung der CK2-Verfügbarkeit in den Chloroplasten könnte dazu führen, dass Phosphorylierungsstellen, die sonst von der CK2 besetzt werden, unbesetzt blieben und die Funktion der CK2 möglicherweise durch andere Kinasen ausgeglichen wurde. Da die untersuchte Mutante GK615F11 sich als eine *knock-down ck2*-Mutante herausstellte, war es vorstellbar, dass einige ihrer Substrate im Wildtyp zwar phosphoryliert wurden, jedoch mit einer geringeren Intensität. Außer der Phosphopeptide, welche ausschließlich im Wildtyp oder der *ck2* detektiert wurden, konnte eine Reihe potentieller Substrate analysiert werden, welche in beiden Linien, jedoch mit unterschiedlichen Intensitäten gefunden wurden. Die Übersicht dieser Phosphopeptide wurde in der Tabelle 25 zusammen gefasst.

Tabelle 25: Phosphopeptide, welche wohl im Wildtyp als auch in der *ck2*, jedoch mit unterschiedlicher Intensität detektiert wurden.

Protein	Beschreibung	Phosphopeptid
AT2G47400.1	CP12 domain-containing protein 1	AtSEGEISEKVEK
AT4G04020.1	Fibrillin	AtDIDDEWGQDGVER
AT3G60750.1	Transketolase	ALPTYtPEsPGDATR
AT5G63420.1	Ribonuklease J	ENSRDDDELADAsDSETK
AT2G37660.1	NAD(P)-BP	ALDLASKPEGtGTPTK
AT1G68830.1	<i>state transition 7</i>	TVTetIDEISDGR
AT2G46820.1	PSI-P	AttEVGEAPATTTEAETTELPEIVK
AT2G39730.1	Rubisco-Aktivase	GLAYDtSDDQQDITR

Nach der Auswertung der Daten kristallisierten sich aufgrund der Intensitätenunterschiede in den Detektionsstärken mögliche Substrate heraus, die in Abbildung 39 mit folgenden Ergebnissen zusammen gefasst wurden.

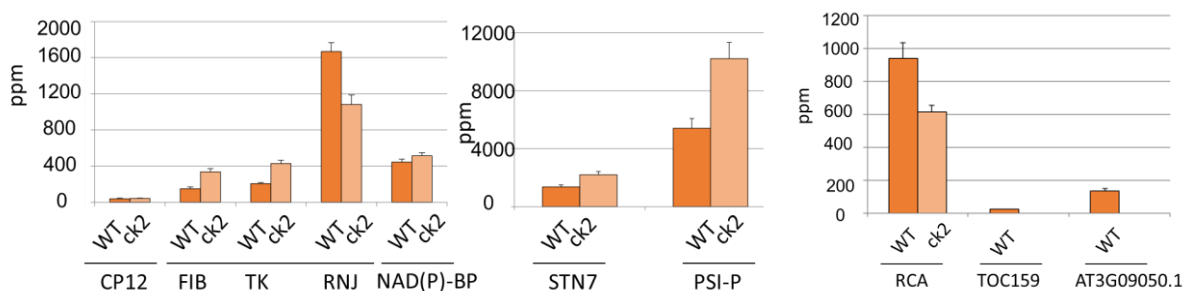


Abbildung 39: Intensitätenvergleich möglicher Substrate, die mittels ungerichteter Proteomics ermittelt wurden. CP12: CP12 domain containing protein; FIB: Fibrillin; TK: Transketolase; RNJ: Ribonuklease J; NAD(P)-BP: NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein PSI-P: Photosystem I P Untereinheit, RCA: Rubiscoaktivase. ( $p < 0,05$ )

CP12 (AT2G47400.1) sowie NAD(P)-BP (AT2G37660.1) könnten aufgrund der zu geringen Intensitätsunterschiede als mögliche Substrate ausgeschlossen werden. Rubisco-Activase (RCA) und Ribonuklease J (RNJ) zeigten als einzige einen geringeren Phosphorylierungsgrad in der *knock-down* Mutante als im Wildtyp. Die Rubisco-Activase wurde als Substrat von Kim *et al.* (2016) bereits ermittelt. Diese Vermutung zeigten die CHIP Experimente bereits 2014 (Schonberg & Bergner *et al.*



2014), die nun als bestätigt angesehen wurden. TOC 159 ist ein Translokon auf der Außenmembran des Chloroplasten und vermittelt den Transport einer großen Anzahl an Präproteinen mit aminoterminaler Transitsequenz in das Innere des Chloroplasten und wurde *in vitro* bereits 2010 von Birgit Agne als Substrat der CK2 vermutet (Agne und Kessler 2009). Hiermit konnte TOC 159 als Substrat der CK2 bestätigt werden. RNJ kann zu den möglichen Substraten gezählt werden. Fibrillin, Transketolase und *state transition 7* (STN7) haben in der Mutante eine weitaus höhere Intensität als im Wildtyp. Ihre Zuordnung zu Substraten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 39).

Die Unterschiede in den beiden Phosphoproteomen ließen den Schluß zu, dass die Signalübertragung in den GK615F11-Blättern verändert ist. Wobei es jetzt sehr interessant wurde das Phosphoproteome auf der Ebene der Wurzeln näher zu betrachten.

#### **4.6.2 Phosphoproteomics in den Wurzeln**

Statistische Auswertungen der sauren Konsensussequenz der CK2 vermuten die stärkste Phosphorylierungsaktivität der chloroplastidären CK2 in den Chloroplasten (Reiland et al., 2009). Trotz einer Vielzahl von putativen Substrate war die cpCK2 sehr wenig abundant in photosynthetisch aktiven Chloroplasten, während sie in nicht-photosynthetischen Organen wie Wurzeln zu einem höheren Level akkumulierte (Baerenfaller et al., 2011). Die Wurzeln höherer Pflanzen waren metabolisch hoch aktiv und weitgehend unerforscht. Aufgrund ihrer geringen Größe und schweren Handbarkeit waren die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* ein selten verwendetes Untersuchungsobjekt. Die Hauptaufgabe der Wurzeln ist es eine sehr große Gruppe sekundärer Metabolite zu synthetisieren um den Stoffwechsel auf unterschiedliche biotische und abiotische Stressfaktoren umzustellen. Die Vitalität einer Pflanze und ihre Entwicklung hängen davon ab, in wie weit die Pflanze in der Lage war auf die Veränderungen ihrer Umwelt zu reagieren. Die Fähigkeit die Verfügbarkeit von Wasser und anderen Nährelementen zu erfassen machen die Wurzel zu einem Schlüsselorgan in der Pflanze. Erst im letzten Jahr erschien die erste Publikation zu Proteome-Analyse der *Arabidopsis thaliana* Wurzeln (Nikonorova et al., 2018). Meine Analyse der Phosphoproteine begrenzte sich auf die Gegenüberstellung des Phosphoproteomes des Wildtyps und der Mutante. Mit den neugewonnenen Informationen sollten die Kenntnisse über die Rolle der plastidären CK2 in der Wurzel im Regulationsmechanismus und –netzwerk von *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze

erweitert werden. Der Abgleich der in der Literatur beschriebenen phosphorylierten Peptide erfolgte mit Hilfestellung des Programms „PhosPhAt 4.0“. Es wurden im Wildtyp mit einer FDR von <5% mittels beider Methoden collision induced dissociation (CID) und multi-stage activation (MSA) insgesamt 365 phosphorylierte Peptide gefunden. Daneben steht die *ck2*-Mutante mit 342 mittels beider Methoden detektierten Phosphopeptiden. Es ist also eine etwa gleiche Zahl an Phosphopeptiden detektiert worden. Es ist auffällig, dass bei gleicher Handhabung der Proben, die Mutante einen etwas höheren Anteil an Phosphopeptiden aufwies, die ausschließlich dort detektiert werden konnten. Im Gegensatz zu den Blättern, die durch das Chlorophyll in den Chloroplasten grün gefärbt sind, besitzt die Wurzel keine Farbpigmente in ihren Plastiden, den so genannten Leukoplasten. Das retardierte Wurzelwachstum der *ck2*-Mutante in den Phänotypisierungsexperimenten machte neugierig und somit wurden die Wurzeln der *ck2*-Mutante näher untersucht. Das Problem der mutanten Wurzeln war, dass sie zum untersuchten Zeitpunkt von 2 Wochen sehr klein waren, und, dass aufgrund der Versuchsdurchführung die Pflanzen auf ½-Murashige-Scoog-(MS)-Medium angezogen werden mussten und nicht auf Erde wie in den Experimenten mit den Rosetten. Alle anderen Versuchsanordnungen waren analog, bis auf die fehlende Chlorophyllbestimmung.

*Tabelle 26: In Wurzeln vom 2 Wochen alten, ausschließlich WT-Pflanzen gefundenen Phosphopeptide. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. Farblich hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.*

ATG	Protein	Sequenz	CID	MSA	MAP-Man B	Beschreibung
AT1G35340	ATP-dependent protease La (LON) domain protein	MNYEsSNELTsK	□■□	□□□	29.5	Proteindegradation
AT1G47840	hexokinase 3	TVVAMDGALyEK	□□□	□■□	2.2.1.4	CHO Metabolismus
AT1G75010	GTP binding	ELEGSEVKTILEsYK	□□□	■□□	31.2.5	Plastidär. Zellteilung
AT3G11980	Jojoba acyl CoA reductase-related male sterility protein	DAQERSGLMSGMSVDsK	□■□	□□□	33.99	Entwicklung
AT3G21110	purin 7	GyVtGStDTSLWTVyNK	□□□	□■□	23.1.2.7	Nucleotidsynthese
AT3G52140	<i>tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein</i>	VQLAEGMLSEsytFFsEAFSILQQVTGPMHR	□■□	□□□	35.1.27	Tetratricopeptide repeat (TPR)
AT3G56010	unbekanntes Protein	PsPFAsyISLNsRR	□■□	□□□	29.2.1.99.99	Proteinsynthese
AT4G00630	K <sup>+</sup> efflux antiporter 2	LQVALESLEAEGYntSEESEVRDGVK	■□□	□□□	34.15	Transporter
AT4G37270	heavy metal atpase 1	GSVyRALGLMVAAASPCALAVAPLAYATAIssCAR	□□□	□■□	34.12	Metalltransport
AT5G52920	<i>plastidic pyruvate kinase beta subunit 1</i>	MAQVVAtRSIQGsMLsPNGGsVSTR	□■□	□■□	4.2.14	Glykolyse

In den Wurzelproben wurden insgesamt weniger Phosphopeptide detektiert als in den Blättern. Die meisten gefundenen Phosphopeptide waren sowohl im Wildtyp als auch in der *ck2*-Mutante vorhanden. Es wurden insgesamt zehn Phosphopeptide ausschließlich im Wildtyp detektiert). Funktion aller ausschließlich im Wildtyp detektierten Phosphopeptide war bekannt. Die Funktionen der in den WT Wurzeln gefundenen Phosphopeptide, denen bestimmte Proteine zugeordnet wurden, liegen im Bereich der Entwicklung, Proteinsynthese und –degradation. Es konnten im Wildtyp 2 Phosphopeptide der Proteine detektiert werden, dessen Gene mit CK2 coexprimiert

waren. Diese sind AT3G52140, welches ein *Tetratricopeptide repeat* ist (TPR), ein Protein-Protein Interaktionsmodul und AT5G52920, eine plastidäre Pyruvat-Kinase. Die Koexpression wurde mittels „Genevestigator“ ermittelt (<https://genevestigator.com/gv/>). Weiterhin konnten vier bisher in der Literatur nicht erwähnter Phosphopeptide identifiziert werden (AT1G35340, ein Protein der Proteindegratation; AT3G56010 ein unbekanntes Protein der Proteinbiosynthese, AT3G11980 ein Protein der Entwicklung und AT3G37270, ein Metalltransportprotein). Von den bisher nicht beschriebenen und ausschließlich im WT-Wurzel gefundenen Phosphopeptiden erfüllten zwei die Voraussetzungen ein Substrat der CK2 zu sein, und zwar das AT1G35340 und AT4G00630, eine ATP-abhängige Protease und ein K<sup>+</sup>-Efflux Antiporter. Der Phosphorylierungsstatus der *ck2*-Wurzeln wies analog zum Phosphorylierungsstatus der *ck2*-Blätter einen höheren Grad an Phosphorylierung auf, es wurden mehr Phosphopeptide in den *ck2*-Wurzeln gefunden als in den Wildtyp-Wurzeln (Tabelle 27).

*Tabelle 27: In Wurzeln von 2 Wochen alten, ausschließlich ck2-Pflanzen gefundenen Phosphopeptide. Mit dem CK2-Gen ko-exprimierte Gene sind kursiv dargestellt. Farblich hervorgehoben sind bereits in Literatur erwähnten Phosphopeptide.*

ATG	Protein	Sequenz	CID	MSA	MAP-Ma	Beschreibung
AT1G15210	pleiotropic drug resistance 7	AGsNKETEMESVSAK	□□□	□■□	34.16	ABC-Transporter
AT1G17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	FStVGSDSDEYNPTLPKPR	■□□	□□■	13.1.5.1.1	AS-Metabolismus
AT1G48650	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	MLGGYLEFFMKPTLAYtyLSLK	■□□	□□□	28.99	DNA.unspecified
AT1G67120	ATPase;Nukleotidbindung	THQENsPIHNFQDGNRS	□□■	□□□	29.2.2	Proteinsynthese
AT2G16070	plastid division2	SEIIGNQDKDFDSISsEDVDEAEAEER	□□■	□□□	35.2	unbekannt
AT3G18890	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	ASSVVTEAsPtNLNSK	■□□	□□□	30.11	Signaling
AT3G20540	polymerase gamma 1	ETVALLMNQyR	□■□	□□□	28.1	DNA-Synthese
AT3G47070	lokalisiert in der Thylakoidmembran	EGTtTGGRGTVR	□■□	□■□	35.2	unbekannt
AT3G50380	Protein unbekannter Funktion (DUF1162)	yVNAyEyLLsLAGYSR	□□□	□□■	35.2	unbekannt
AT5G01530	LHCII	NLAGDVIGTRtEAADAK	□■□	□■□	1.1.1.1	LHCII
AT5G08540	unbekannt	TAESSsDKEEDSNEEDSNTTS	□■□	□□□	35.2	unbekannt
AT5G17520	root cap 1 (RCP1)	SINSEsDSDFPHENQQGNPGLGK	□□■	□□■	2.2.2.6	CHO Metabolismus/!
AT5G42860	unbekannt	RPAYFVQsPSR	□□■	□■□	35.2	unbekannt

In den Proben der Mutanten Wurzeln wurden insgesamt 15 exklusive Phosphopeptide nachgewiesen, fünf von ihnen unbekannter Funktion (AT2G16070, AT3G47070, AT3G50380, AT5G08540, AT5G42860). Die restlichen Phosphopeptide waren metabolisch oder für die Signalübertragung verantwortlich (Tabelle 27). Drei der detektierten Phosphopeptide erfüllten die Voraussetzungen ein Substrat der CK2 zu sein (AT1G15210, eine ATP bindende Kasette mit der Lokalisation im Chloroplasten und Wurzel, AT5G08540 *ribosomal RNA small subunit methyltransferase J* mit der Lokalisation im Chloroplasten und AT1G17520.1 *Single Myb Histone (SMH) gene*

*family member* mit nukleärer Lokalisation).

In der Wurzel wurden insgesamt weit weniger phosphorylierter Peptide detektiert als im Blatt (Tabelle 26; Tabelle 27). Auch die Anzahl der exklusiv im Wildtyp oder der Mutante vorkommenden war im Vergleich zu den Blattproben geringer. Die Peptide mit den ATG-Nummern AT1G35340, AT3G11980, AT3G56010, AT4G37270 wurden in der Datenbank „PhOsPhaT“ bisher nicht als Phosphopeptide aufgeführt, was die Vermutung nahelegte, dass es gelungen war vier neue Phosphopeptide zu detektieren. Jedoch wäre weitere Evaluierung der Daten notwendig um die Vermutung mit ergänzenden Methoden zusätzlich belegen zu können.

#### 4.6.3 Phosphorylierungsmuster WT/ Mutante

Nach den erfolgten Phosphoproteomstudien wurde ein Vergleich der Phosphorylierungsmotive zwischen den WT- und *ck2*-Linien auf der einen und den Blättern und Wurzeln auf der anderen Seite, angestrebt.

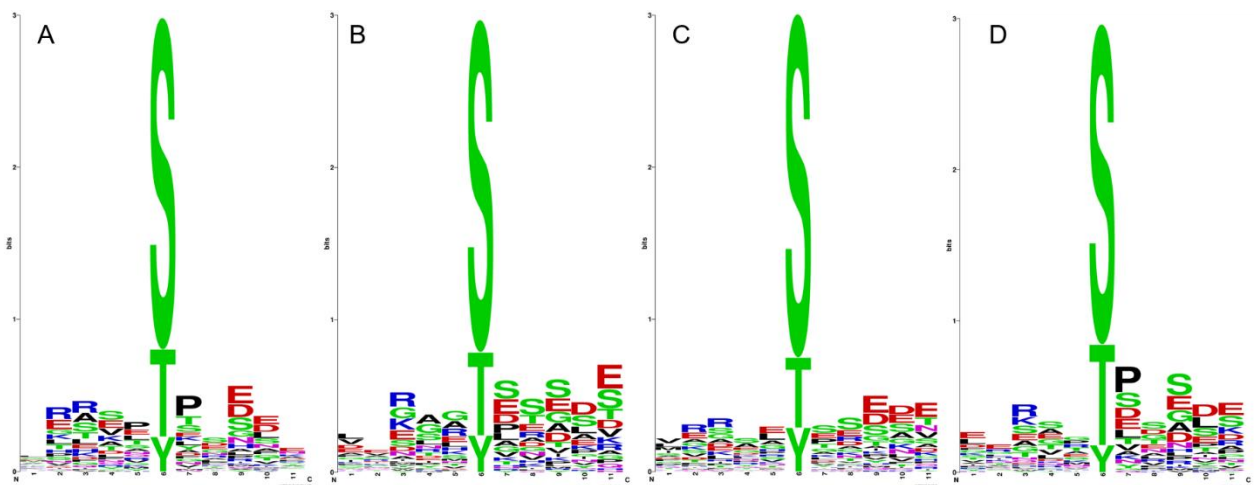


Abbildung 40: Weblogo aus dem Gesamtdatensatz der phosphorylierten Peptide aus WT-Blatt (A); *ck2*-Blatt (B); WT-Wurzel (C); *ck2*-Wurzel (D)

Die Extraktion des Phosphorylierungsmotive (Abbildung 40) aus dem kompletten Datensatz der phosphorylierten Peptide erfolgte mit dem Programm „WebLogo“ (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Betrachtete man die Phosphorylierung der ausschließlich chloroplastidär vorkommenden Phosphopeptide ergab sich ein differenziertes Bild. Es konnten keine Unterschiede im Verhältnis der S/T/Y Phosphorylierung zwischen den Blättern des 2 Wochen alten Wildtyps und der Mutante festgestellt werden (Abbildung 40 A, B). Der -1 bis -3 N-terminaler Bereich der Probe aus den Blättern des Wildtyps (A) war etwas saurer als der entsprechende

Bereich in der Mutante. Nach der Phosphorylierungsstelle war eine Änderung zu beobachten. Der +1 bis +3 Bereich des Wildtyps war wesentlich saurer als der der Mutante. In der Wurzel (Abbildung 40, C/D) war zu sehen, dass der Anteil der umstrittenen Tyrosinphosphorylierung in der WT-Wurzel höher als in der Mutanten-Wurzel lag. Weiterhin war der Anteil der Serinphosphorylierung in der Mutante leicht in Richtung der Threoninphosphorylierung verschoben. Sowohl -1 bis -3 als auch +1 bis +3 Bereiche relativ zu der Phosphorylierungsstelle in der Wurzel des Wildtyps waren saurer als die der Mutanten-Wurzeln. Somit wurde eine Verschiebung der Phosphorylierungsmotive sowohl in Blättern als auch Wurzeln der *ck2*-Linie in Richtung weniger saurerer Substrate beobachtet. Die bisher entdeckten chloroplastidäre Kinasen waren ausschließlich Serin/Threonin-Kinasen. Die Tyrosinphosphorylierung durch Kinasen wurde stark diskutiert und ist umstritten. Da bei der Auswertung der Phosphopeptide mittels „Weblogo“ ein beachtlicher Anteil an Tyrosinphosphorylierung gefunden wurde, wurden weitere Experimente durchgeführt um dieser Fragestellung nachzugehen.

#### **4.7 Tyrosinphosphorylierung**

CK2 ist als Serin/Threonin Kinase bereits lange etabliert. In Säugetierzellen jedoch wurde eine Tyrosinphosphorylierung durch die CK2 nachgewiesen (Vilk *et al.*, 2008). Die Tyrosinphosphorylierung allgemein bei *Arabidopsis thaliana* ist umstritten. Im Zuge der Phosphoproteom-Analyse wurde ein Experiment mit anti-Tyr-Antikörper zur Tyrosinphosphorylierung mit folgenden Ergebnissen durchgeführt.

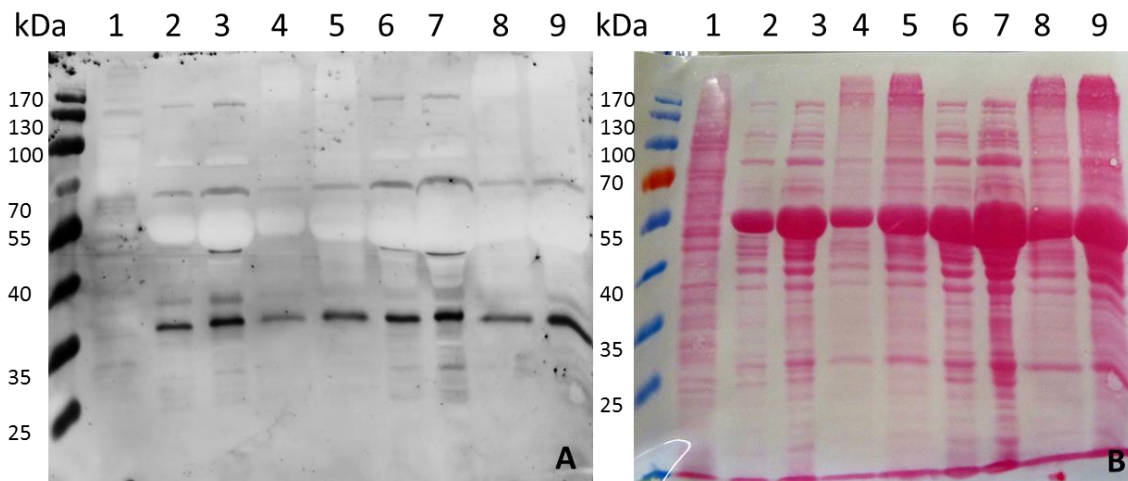


Abbildung 41: A Western Blot mit anti-Phosphotyrosin Antikörper. B die dazugehörige Proteinfärbung mit Ponceau S.1 menschliche Krebszellen (HEK293T) als Positivkontrolle, 2 *A. thaliana* WT-Stroma 50  $\mu\text{g}$ , 3 *A. thaliana* ck2-Stroma 50  $\mu\text{g}$ , 4 dephosphoryliertes WT-Stroma 50  $\mu\text{g}$ , 5 dephosphoryliertes WT-Stroma ck2 50  $\mu\text{g}$ , 6 WT-Stroma 100  $\mu\text{g}$ , 7 ck2-Stroma 100  $\mu\text{g}$ , 8 dephosphoryliertes WT-Stroma 100  $\mu\text{g}$ , 9 dephosphoryliertes ck2-Stroma 100  $\mu\text{g}$ .

In der Abbildung 41 war zu sehen, dass die Positivkontrolle mit menschlichen Krebszellen (HEK293T) in der Spur 1 eindeutig vielfache Tyrosinphosphorylierung aufwies. In den anderen Spuren waren vielfältige Signale erkennbar. Ein Rückgang der Signale trat wie erwartet nach dem Entfernen der Phosphatgruppen aus den Stromaproteinen ein (Spuren 4,5,8,9). Die Spuren 3 und 7 mit ck-Stroma wiesen einen höheren Grad an möglicher Tyrosinphosphorylierung auf. Es galt zu überprüfen, ob der Anti-Phospho-Tyrosinantikörper auch Serin Phosphorylierungsstellen erkennt, was laut Herstellerangaben nicht der Fall sein sollte. Dazu wurde Casein verwendet, von dem bekannt war, dass es an 5 Serinstellen von der CK2 phosphoryliert wurde und keine Tyrosin Phosphorylierungsstellen besaß.

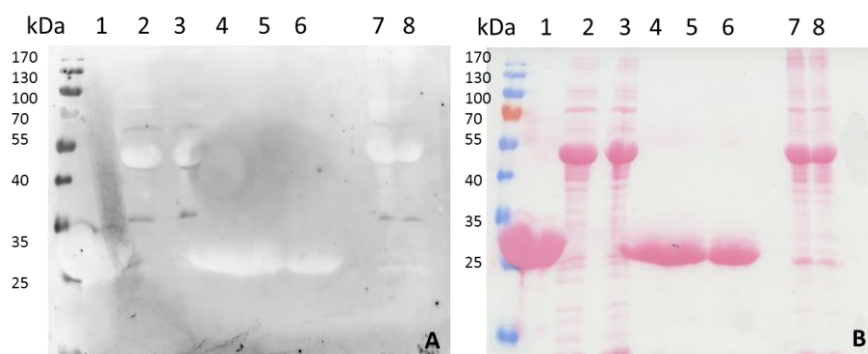


Abbildung 42: A Western Blot eines anti-Phosphotyrosin Antikörper. B die dazugehörige Proteinfärbung mit Ponceau S.1 Casein als Negativkontrolle, 2 *A. thaliana* WT Stroma 30  $\mu\text{g}$ , 3 *A. thaliana* ck2 Stroma 30  $\mu\text{g}$ , 4-6 dephosphoryliertes Casein, 7 dephosphoryliertes WT-Stroma 30  $\mu\text{g}$ , 8 dephosphoryliertes ck2-Stroma 30  $\mu\text{g}$ .

Das Ergebnis (Abbildung 42) war, dass der Antikörper ebenfalls zumindest eine Stelle der Serinphosphorylierungen erkannte, was darauf zurück geführt wurde, dass Casein in zu starkem Überschuss eingesetzt wurde. In der Spur 1 war das Signal des phosphorylierten Caseins in Höhe 35 kDa eindeutig. Das dephosphorylierte Casein in Spuren 4-6 zeigte wie erwartet kein Signal. Es war nicht eindeutig auszuschließen, dass die vorhandenen Banden in Spuren 2,3, 6,7 von der Tyrosinphosphorylierung stammten. Mit Sicherheit gezeigt wurde die Tatsache, dass der Anti-Phospho-Tyrosinantikörper auch Serin Phosphorylierungsstellen erkennt, auch wenn es im Falle von Casein eine von 5 war. Somit wäre die Tyrosinphosphorylierung nicht komplett von der Hand zu weisen, da zum einen ein gewisser Anteil der Phosphopeptide mit Tyrosinphosphorylierung mittels Massenspektrometrie detektiert wurden und zum anderen die Tyrosinphosphorylierung, mittels Anti-Tyrosinantikörper gezeigt wurde. Weitere Experimente mittels spezifischerer Antikörper sind notwendig, um diese Fragestellung zu klären. Nun galt es nach ungerichteten Phosphoproteom-Analysen und komplementierten Mutante herauszufinden, ob der veränderte Phosphorylierungsstatus der *ck2*-Linie in der komplementierten TAP-CK2-Linie wieder aufgehoben wurde. Um die Menge an Daten einzuschränken wurde eine gerichtete Phosphoproteom-Analyse durchgeführt.

#### **4.8 Gerichtete Phosphoproteomanalyse**

Alle Originaldaten befinden sich im *supplement* Ordner „gerichtete Phosphoproteomics“. Die gerichtete Phosphoproteomanalyse beruhte darauf, dass zu einem Zeitpunkt der Messung nicht die intensivsten Peaks analysiert wurden, sondern nur die intensivsten Peaks einer vorher durch die *inclusion list* genau definierten *m/z*-Werte. Daher können auch wenig abundante Proteine, deren Signale bei der ungerichteter Analyse von hoch abundanten Proteinen maskiert werden, detektiert werden. Die Auswertung der „Velos“-Daten beruhte, aufgrund der Vielzahl der detektierten Peptide, auf ausschließliche Detektion in WT- oder in *ck2*-Linie. In der Zwischenzeit war die komplementierte Linie so weit untersucht und nachgezüchtet, dass eine große Anzucht und eine  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung für die MS-Untersuchung möglich wurde. Bei den durch den „CHIP“ und die ungerichtete Phosphoproteom-Analyse ermittelten möglichen Substraten galt es herauszufinden, ob zum einen die Herabsetzung der Intensität in der komplementierten Linie wieder aufgehoben wurde und zum anderen, ob bei den Substraten, die in der Mutante einen höheren Phosphorylierungsgrad aufwiesen, die Phosphorylierung auch in den

komplementierten Pflanzen (TAP-CK2) geringer war. In die *inclusion list* wurden nun auch die möglichen Substrate aufgenommen, die sowohl im WT, als auch in der CK2, jedoch mit geringerer Intensität, detektiert wurden. Die *inclusion list* (Tabellen 28- 29) wurde von Johann Galonska anhand der von mir durchgeführten „Velos“-Messungen erstellt und umfasst 38 Peptide. Die TiO<sub>2</sub>-Anreicherung für die gerichtete Phosphoproteomanalyse und ihre Messung wurde von Juliane Siebert, jedoch mit meinen Proben durchgeführt. Die vergleichende Umrechnung der Signalintensitäten erhaltener Phosphopeptide wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden die Gesamtintensitäten aller ermittelten Phosphopeptide in der Wildtyp-, *ck2*-Linien ermittelt. Die Gesamtintensität der jeweiligen Linie wurde durch addieren der Signale aller Phosphopeptide errechnet. Anschließend wurde die Summe alle gefundenen Signale eines Phosphopeptids in der jeweiligen Linie addiert mit 10<sup>6</sup> multipliziert und das Ergebnis durch die ermittelte jeweilige Gesamtintensität der Linie dividiert, somit ergab sich der Anteil des Phosphopeptids an der Gesamtintensität als *parts per million* (ppm).

*Tabelle 28: Inclusion list Teil 1. Die in der Peptidsequenz kleingeschriebene Aminosäuren liegen phosphoryliert vor. Grün steht für eindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure, Rot für eine nichteindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure.*

Protein	Beschreibung	Peptidsequenz	m/z	Ladung	RT (min)
ATCG0071	Photosystem II reaction center protein H	AtQ <i>t</i> VEDSSR	627,23	2	13,06
AT3G0905	8-amino-7-oxononanoate synthase	sGDGTSDDSDPDPKPEGDTR	771,30	3	26,09
AT5G1446	Pseudouridine synthase family protein	LYG <i>s</i> DSEDNSSR	769,79	2	27,75
AT4G1034	Light harvesting complex of photosystem II 5	AV <i>s</i> ETSDELAK	615,27	2	26,07
AT3G6316	Outer envelope protein 6 Nr.1	DKSDSDDA <i>t</i> VPPPSGA	819,83	2	24,92
AT1G6920	Fructokinase-like 2	AAAAS <i>s</i> DVEEVKTEK	807,87	2	30,58
AT4G0251	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 159	AS <i>s</i> GIEAH <i>s</i> DEANISNNMSDR	767,64	3	35,13
AT3G6316	Outer envelope protein 6 Nr.2	VEK <i>s</i> GGEVNFPK	685,82	2	40,45
AT2G3766	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	ALDLASKPEG <i>t</i> GTPTK	833,41	2	39,07
AT1G6883	STT7 Homolog STN7	TVTE <i>t</i> IDEISDGRK	822,38	2	46,88
AT3G6075	Transketolase	ALPTY <i>t</i> PE <i>s</i> PGDATR	828,37	2	48,64
AT2G3973	Rubisco Aktivase	GLAYD <i>t</i> SDDQQDITR	889,37	2	47,71
AT2G2880	Alb 3 Nr.1	DTVELVEESQ <i>s</i> E <i>s</i> EEGSDDEEEE	969,71	3	54,73
AT2G2880	Alb 3 Nr.2	AVAKDTVELVEESQSESEEG <i>s</i> DD	1092,79	3	58,66
AT4G0402	Fibrillin	A <i>t</i> DIDDEWGQDGVER	893,35	2	59,83
AT4G2667	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family	AAND <i>ss</i> NAIDIDGNLSDSNLNTDC	1217,48	3	72,24
AT5G2389	GPI-anchored adhesin-like protein	SPVPESTDGSKDELNIY <i>s</i> QDELDD	1001,76	3	76,25
AT2G4682	Photosystem I P subunit	A <i>t</i> tEVGEAPATTTEAETTELPEIK	890,09	3	77,89
AT4G0251	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 159	VDG <i>s</i> SEEEETEEMIFGSSEAAK	1268,96	2	80,99



Tabelle 29: Inclusion list Teil 2. Die in der Peptidsequenz kleingeschriebene Aminosäuren liegen phosphoryliert vor. Grün steht für eindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure, Rot für eine nichteindeutige Zuordnung der phosphorylierten Aminosäure.

Protein	Beschreibung	Peptidsequenz	m/z	Ladung	RT (min)
AT1G3207	Nuclear shuttle interacting	sssDSDSSEGGDGEKQKEK	1018,88	2	8,60
AT5G0854	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase J Nr.1	TAESsSDKEEDSNEEDSNTTS	1228,93	2	13,47
AT3G4914	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	AGGDEsEIDSSQDEK	823,81	2	26,69
AT3G2607	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	GATAsPDDQLR	605,76	2	28,98
AT5G6342	Ribonuclease J	ENSRDDDELADAsDSETK	1038,90	2	27,28
AT2G3804	Acetyl Co-enzyme a carboxylase carboxyltransferase alpha	ELAAEEsDGSVKEDDDDDDEDSSES	946,69	3	33,32
AT2G4740	CP12 domain-containing protein 1	AISEGEISEKVEK	743,84	2	32,99
AT3G0371	Polynucleotide Phosphorylase	ALLPEsETDKDSQK	820,87	2	39,45
ATCG0048	Ribulose-bisphosphate carboxylase large subunit	LSGGDHHAGIVVGK	764,37	2	35,54
ATCG0048	ATP synthase subunit beta	TNPtTsNPEVSIR	748,34	2	42,32
AT5G1474	Carbonic anhydrase 2	VLAESEsAFEDQCGR	932,87	2	48,39
AT1G0179	K+ efflux antiporter 1	IGESSEsSDETEATDLKDAR	1110,46	2	46,51
AT5G4020	DegP protease 9	EASANEASLPQsPEPVsASEANPSF	1009,10	3	44,74
AT3G1278	Phosphoglycerate kinase 1	SVGDLTsADLK	593,27	2	55,54
AT1G1987	IQ-domain 32	VEPEEsSDDVIIR	898,40	2	60,12
AT4G2036	RAB GTPase homolog E1B	SYVTGVEMFQK	743,32	2	66,40
AT5G0854	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase J Nr.2	KNSSVEEEtEEEVEEDMPWQEK	964,07	3	67,35
AT5G5296	tRNA dimethylallyltransferase	SSDAEEVsDTEDEWLK	960,38	2	77,59
AT5G2674	DEAD box RNA helicase (RH3)	sLGLsDHDEYDLGDNNNVEADDGI	1143,81	3	78,93

Durch die direkte Suche der zu den jeweiligen Phosphopeptiden zugehörigen m/z-Werte wurde die Menge an Daten eingeschränkt, was eine bessere Übersicht über die Daten ermöglichte. Durch das Hinzuziehen der TAP-CK2-Linie wurden nun die Phosphopeptide verglichen, die im Wildtyp und TAP-CK2-Linie vorhanden, in der GK615F11 jedoch nicht oder mit deutlich geringerer Intensität vorlagen.

Tabelle 30: Proteine und die dazugehörigen Phosphopeptide, die ausschließlich im WT und TAP-CK2 phosphoryliert vorlagen.

Protein	Beschreibung	Peptidsequenz
AT1G69200.1	Fructokinase-like 2 (FLN2)	AAAASsDVEEVKTEK
AT4G10340.1	Light harvesting complex of PSII 5 (LHCB5)	AVsETSDELAK
ATCG00480.1	ATP synthase beta subunit (ATPB)	TNPtTsNPEVSIR

Diese drei Proteine lagen ausschließlich im Wildtyp und der TAP-CK2-Linie phosphoryliert vor. FLN2 und ATPB besaßen sogar die für die Phosphorylierung durch CK2 notwendige Konsensussequenz (Tabelle 30). Ein Teil der Phosphopeptide der inclusion list wurde nur im Wildtyp in phosphorylierter Form detektiert (Tabelle 31).

Tabelle 31: Proteine, die ausschließlich im Wildtyp phosphoryliert vorlagen.

<b>Protein</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Peptidsequenz</b>
AT3G09050.1	8-Amino-7-Oxonanoate synthase	SGDGTSDsDSDPDPPKPEGDTR
AT5G14460.1	<i>Pseudouridine synthase family protein</i>	LYGsDSEDENSSR
AT3G49140.1	<i>Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein</i>	AGGDEsEIDSSQDEK
AT3G03710.1	Polynukleotid Phosphorylase (PNP)	ALLPEsETDKDSQK
AT5G26742.2	DEAD-box RNA-Helicase (RH3)	SLGLsDHDEYDLGDGNNNVEADDGEEELAIK
AT2G38040.1	Acetyl Co-enzyme A Carboxylase <i>alpha subunit</i>	ELAAEESDGSVKEDDDDDDEDSSSESGK
AT1G01790.1	K <sup>+</sup> -Efflux antiporter 1	IGESSEsSDETEATDLKDAR
AT5G08540.1	<i>Ribosomal RNA methyltransferase J (rRNA MTJ) 1 small subunit</i>	tAESSSDKEEDSNEEDDSNTTS

Alle zu den Proteinen gehörigen Phosphopeptide waren im Besitz der Konsensussequenz und könnten, obwohl in der komplementierten Linie nicht nachgewiesen, als Substrate der CK2 nicht ausgeschlossen werden. Die Mehrzahl der Phosphopeptide der *inclusion list* wurde in allen drei Linien nachgewiesen (Wildtyp, *ck2* und TAP-CK2). Jedoch waren die Intensitäten der Detektionen bei der *ck2* deutlich verringert. Die Tabelle 32 stellte die Übersicht der Proteine mit den dazugehörigen Phosphopeptiden dar.

Tabelle 32: Proteine mit den dazugehörigen Peptiden, die in allen drei Linien, jedoch in der *ck2*-Linie mit verringerter Intensität, nachgewiesen wurden.

Protein	Beschreibung	Peptidsequenz
AT3G63160.1	<i>Outer envelope protein 6 Nr. 1 (OEP6-1)</i>	VEKsGGEVNFPK  DKSDsDDATVPPPSGA
AT2G39730.1	Rubisco-Activase (RCA)	GLAYDtSDDQQDITR
AT4G04020.1	Fibrillin (FIB)	AtDIDDEWGQDGVVER
AT5G63420.1	Ribonuclease J (RNJ)	ENSRDDDELADAsDSETK
AT3G12780.1	Phosphoglycerat-kinase 1 (PGK1)	sVGDLTsADLK
AT5G52960.1	tRNA- Dimethyltransferase (tRNA DMT)	SSDAEEVsDTEDEWLK
AT2G47400.1	CP12	ATsEGEISEKVEK
AT5G08540.1	<i>rRNA-methyltransferase J (rRNA MTJ) small subunit</i>	KNSSVEEEtEEEVEEDMPWIQEK

Bis auf das Peptid aus dem „Photosystem-1-P-Untereinheit“, die nicht die für die Phosphorylierung durch CK2 notwendige Konsensussequenz besaß, waren alle detektierten Phosphopeptide gute Kandidaten für Substrate der CK2. Diese waren: Rubisco-Activase, Fibrillin, Ribonuclease J, tRNA Dimethyltransferase, *outer envelope protein 6*, ein Protein aus der Superfamilie der NAD-(P)-bindenden *rossmann-fold*, CP12, Phosphoglyceratkinase 1 und die ribosomale RNA- Methyltransferase J (kleine Untereinheit). Da es sich bei der GK615F11-Linie um eine *knock-down* und keine *knock-out* Mutante handelte war es sehr naheliegend, dass gewisse CK2 Substrate trotz geringerer CK2-Verfügbarkeit dennoch phosphoryliert vorlagen.

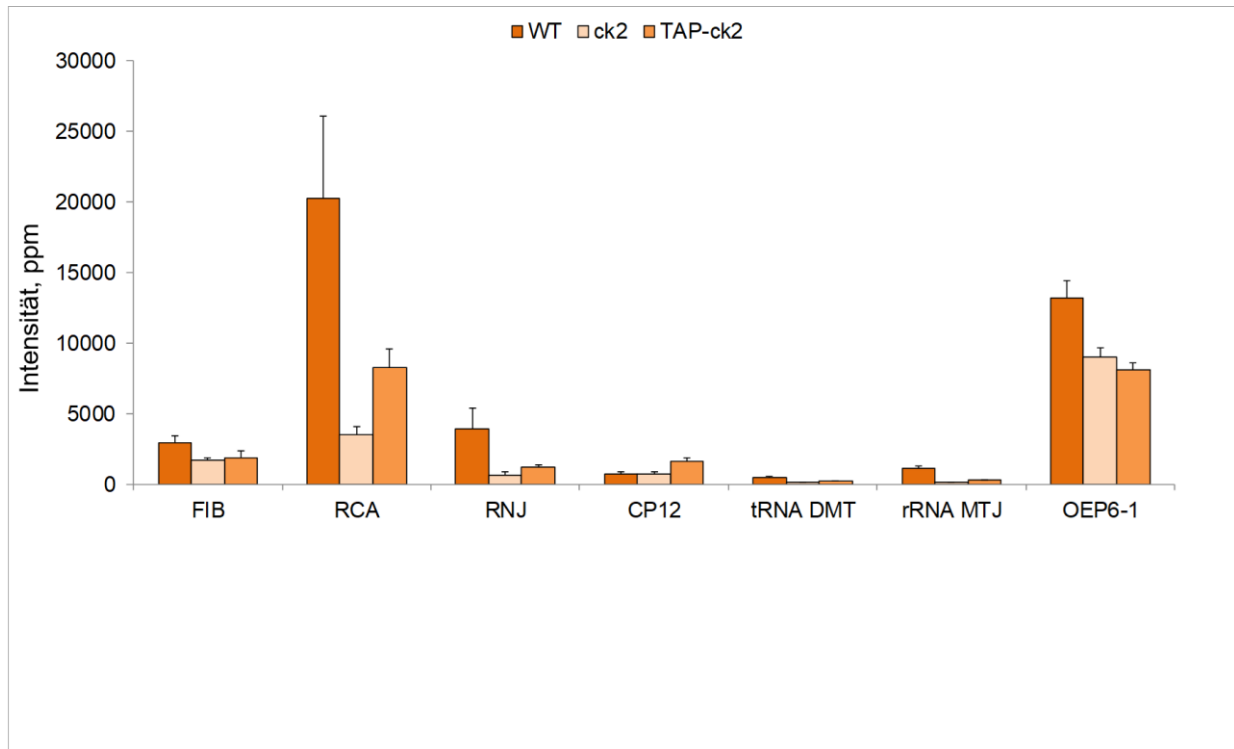


Abbildung 43: Intensitätsvergleiche der in der ck2 mit geringerer Intensität detektierter möglicher Substrate der CK2.

In der Abbildung 43 wurden die Phosphopeptide der Phosphoproteine zusammen gefasst, die in der ck2-Linie eine geringerer Intensität aufwiesen. Im Falle des Fibrillins, *Rubisco-Activase*, Ribonuclease J, tRNA Dimethyltransferase und rRNA Methyltransferase J wurde eine Wiedererlangung eines gewissen Anteils an Phosphorylierungsintensität in der komplementierten TAP-CK2-Linie nachgewiesen. Somit konnte experimentell die teilweise Wiederherstellung des Phosphorylierungsniveaus mancher Substrate der CK2 beobachtet werden.

Tabelle 33: Proteine mit den dazugehörigen Peptiden, die in allen drei Linien, jedoch in der *ck2*-Linie mit höherer Intensität, nachgewiesen wurden.

Protein	Beschreibung	Peptidsequenz
AT1G68830.1	State transition 7 (STN7)	TVTEtIDEISDGRK
ATCG00490.1	RBCL(Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase)	LSGGDHIHAGtVVGK
AT2G28800.1	Alb3	AVAKDTVELVEESQSESEEGsD DEEEEEAR  DTVELVEESQSESEEGsDDEEE EAR
AT2G46820.1	Photosystem I P Untereinheit (PSI-P)	AttEVGEAPATTTEAETTELPEIVK
ATCG00710.1	Photosystem II <i>reaction center protein</i> (PsbH)	AtQtVEDSSR
AT3G12780.1	Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1)	sVGDLTsADLK
AT3G60750.1	Transketolase (TK)	ALPTYTPEsPGDATR

Alb 3 (AT2G28800.1), welches in der *inclusion list* mit zwei Phosphopeptide gelistet wurde (DTVELVEESQSESEEGsDDEEEEEAR und AVAKDTVELVEESQSESEEGsDDEEEEEAR) und die große Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-Carboxylase (ATCG00490.1) wurden in der *knock-down* Linie mit höherer Intensität detektiert als im Wildtyp oder in der TAP-CK2-Linie. Dies war ebenfalls bei dem Phosphopeptid TVTEtIDEISDGRK von Protein *state transition 7* (STN7 (AT1G68830.1)) der Fall. Zur besseren Übersicht wurden nun die Intensitäten aller ermittelten Phosphopeptide der Wildtyp, *ck2*- und der TAP-*ck2*-Linie in einem Diagramm mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt (Abbildung 44).

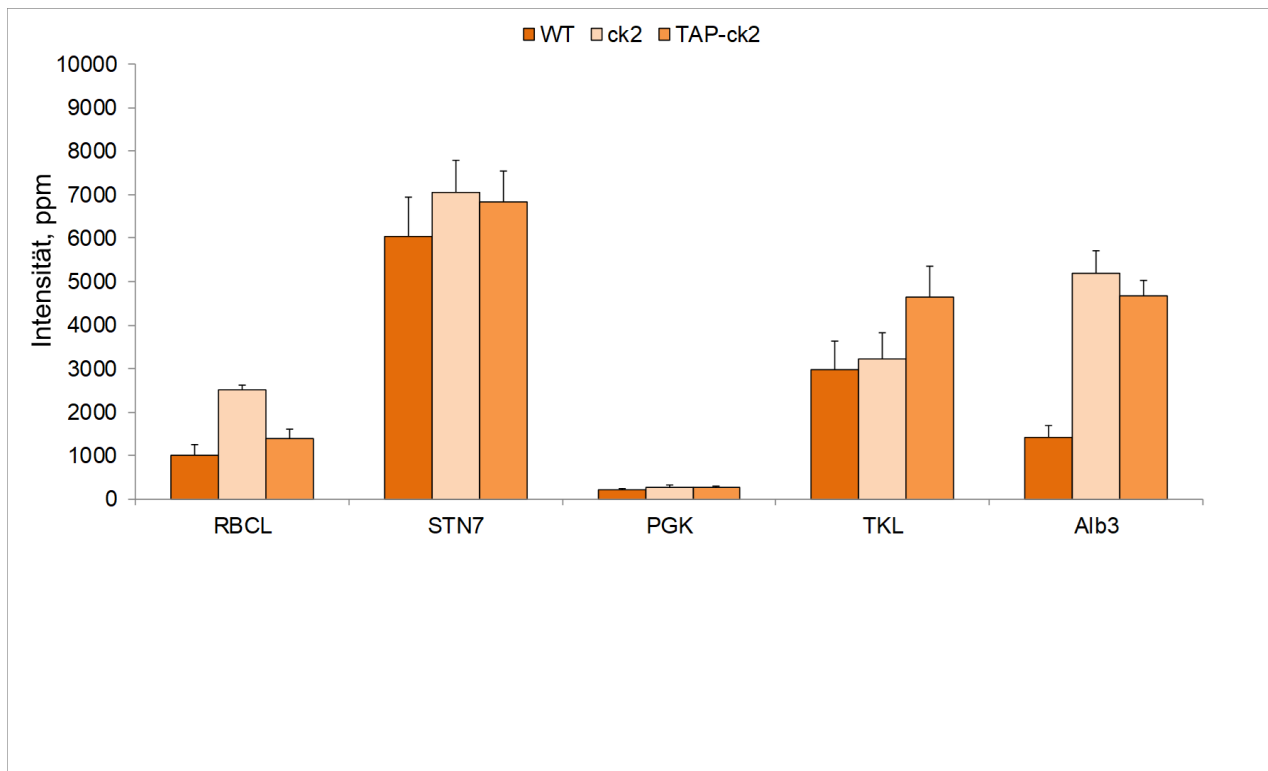


Abbildung 44: Intensitätsvergleiche der in der ck2 mit höherer Intensität detektierter möglicher Substrate der CK2.

Erwartungsgemäß sank die Intensität einiger der detektierten Phosphopeptide in *knock-down* Linie *ck2* im Vergleich zum Wildtyp ab. In der komplementierten Linie wurde der Phosphorylierungsgrad mancher Substrate zu einem gewissen Teil wiederhergestellt, jedoch wurden die Niveaus des Wildtyps nie erreicht (Abbildung 43-Abbildung 44). Mit der gerichteten Phosphoproteom-Analyse aller drei Linie wurden Rubisco-Activase (RCA), Ribonuklease J (RNJ), tRNA-Dimethyl-Transferase J, CP12, *ATP-Synthase- $\beta$ -subunit* (ATPB), und ribosomale-Methyltransferase-J als Interaktionspartner der CK2 nachgewiesen. Nun galt es zu vergleichen, in wie fern die Ergebnisse der gerichteten und der ungerichteten Phosphoproteomeanalysen übereinstimmten.

Es war sehr naheliegend, dass der Phosphorylierungsstatus der Zelle einen direkten Einfluß auf die Metabolitverteilung hat. Denn im Zuge der Phosphorylierung wurden vielfältige Enzyme (z.B Rubisco-Activase) prozessiert und dadurch aktiviert, um in der Zelle weitere Interaktionspartner (zum Beispiel die Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)) in eine aktive Form zu überführen, damit diese ihre Funktion in der Zelle, die Katalyse der Kohlenstoffdioxidbindung an Ribulose-1,5-Bis-Phosphat zum 3-Phosphoglycerat entfalten kann. Aus Gründen der Übersicht wurde die Metabolitanalyse (Kapitel 4.9) hauptsächlich im Bezug auf den

Kohlenstoffwechsel (Calvin-Zyklus) durchgeführt. Weiterhin wurden der Energiehaushalt und die Aminosäurestoffwechsel näher betrachtet.

#### 4.9 Metabolomics

Alle Originaldaten befinden sich im *supplement* Ordner „Metabolomics“. Die Methodik der PLS-DA (**P**artial **L**east **S**quares **D**iscriminant **A**nalysis, Diskriminanzanalyse mit kleinsten partiellen Quadraten) erlaubt eine Diskriminierung der Probetypen *ck2* und WT und analysiert metabolische Muster, die für die Unterschiede beider Probegruppen hauptsächlich verantwortlich sind (Abbildung 45). Zur bestmöglichen graphischen Veranschaulichung dieser Muster wurde entschieden, die *partial least squares* „PLS-loadings“ als S-Plot darzustellen (Abbildung 46). In dieser Form der Darstellung verteilen sich gegenüber dem WT besonders hoch- bzw. herabregulierte Metabolite als intensive Signale auf der Abszisse (*predictability*), während Signale mit hoher Reproduzierbarkeit einen Wert nahe 1.0 bzw. -1.0 auf der Ordinate zeigen (*reliability*). Im Falle signifikanter Unterschiede verteilen sich die Punkte auf dem Plot in Form eines „S“

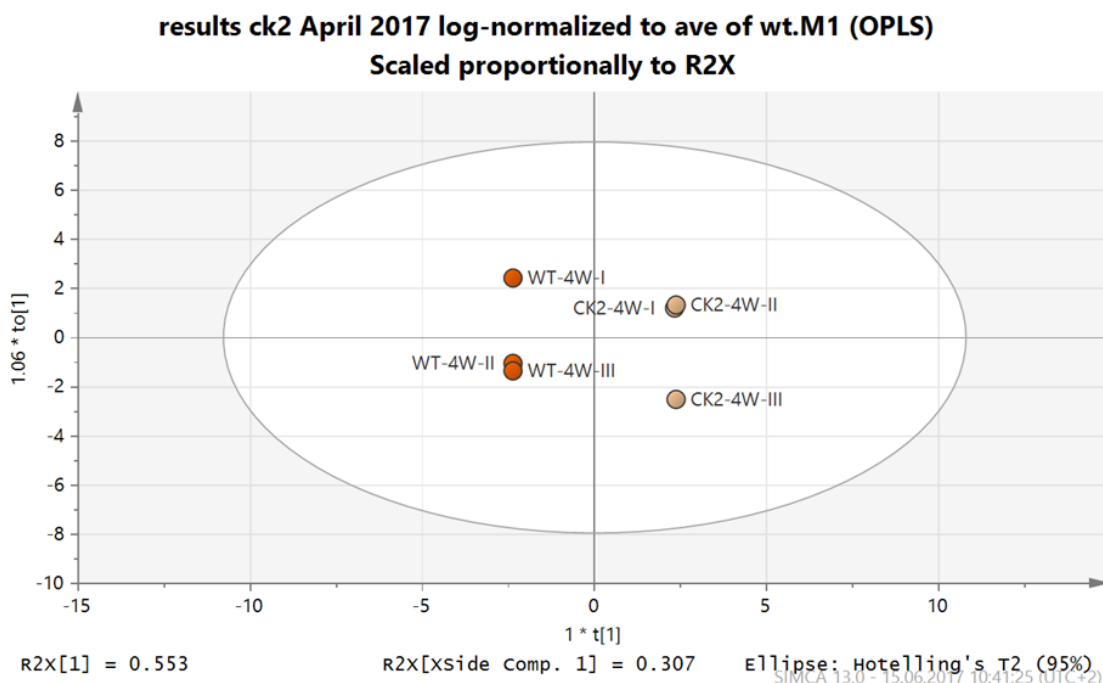


Abbildung 45: oPLS-DA-Scores von Wildtyp und *ck2* ( $n=3$ ). Peak-integrierte Flächendaten von xyz Metaboliten des zentralen Kohlen- und Energiestoffwechsels wurden für die Datenanalyse auf den Mittelwert der WT Gruppe normalisiert,  $\log(10)$ -transformiert und Pareto-skaliert. Abkürzungen: R2X-kumulative Quadratsumme der Flächen gesamt (X, erklärt durch prinzipielle Komponenten (hier 1)). Abkürzungen: WT-4W-I/II/III Wildtyp-4 Wochen alt-Replikatnummer. Entsprechend *ck2*. X= log-normalisierte Peakhöhen relativ zur Blattmenge.

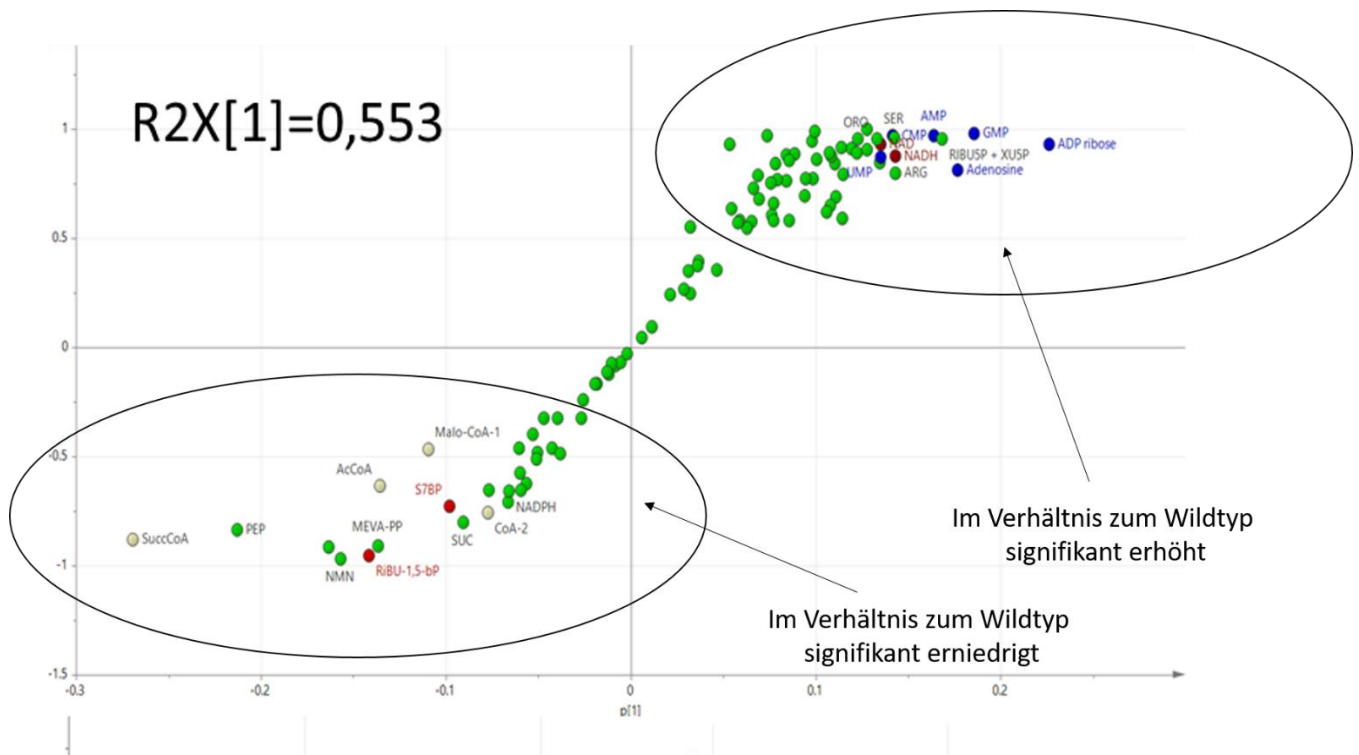


Abbildung 46: oPLS-DA-Loadings (S-Plots) von Wildtyp und *ck2* ( $n=3$ ). Peak-integrierte Flächendaten von xyz Metaboliten des zentralen Kohlen- und Energiestoffwechsels wurden für die Datenanalyse auf den Mittelwert der WT Gruppe normalisiert,  $\log(10)$ -transformiert und Pareto-skaliert. Rot: Metabolite des Calvin Zyklus. Beige: Metabolite, die eine allgemein hohe metabolische Aktivität anzeigen, z.B. TCA und Pools von AcCoA, Succ-CoA, CoA, Fettsäurebiosynthese (Malo-CoA, Glykolyse und Glykoneogenese (PEP)).  $R^2X[1]=0,553$ : Varianzabdeckung.

Metabolitprofiling der polaren Metabolite zeigte Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *ck2*. Zur Untersuchung hydrophiler Metabolite, die im zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus involviert sind, wurden Peakflächen von 106 detektierbaren Metabolitsignalen bekannter Identität miteinander verglichen. Diese beinhalten Intermediate des Tricarbonsäurezyklus, Zuckerphosphate (Glykolyse, Pentosephosphatweg, Calvinzyklus), freie Aminosäuren, Redoxpaare des Glutathions und von NAD-Kofaktoren sowie Nukleotide und Intermediate beider Isoprenoidbiosynthesewege (Mevalonat- und Methylerythritolphosphatweg). Metabolomische Analysen lieferten kumulative Werte des Metabolitpools. Häufig kommen Metabolite jedoch gleichzeitig in mehreren Zellkompartimenten vor (z.B. Fruktose-6-phosphat als Intermediat der Glykolyse (Cytosol) und als Intermediat des Calvin-Zyklus (Plastid)), was eine anteilhafte Zuordnung zu bestimmten Stoffwechselwegen erschwerte. Die Bisphosphate von Ribulose und Sedoheptulose waren jedoch eindeutig dem Calvin-Zyklus zuordenbar und trugen zur Gruppentrennung zwischen dem Wildtyp und der *ck2* bei (Abbildung 45-Abbildung 46).



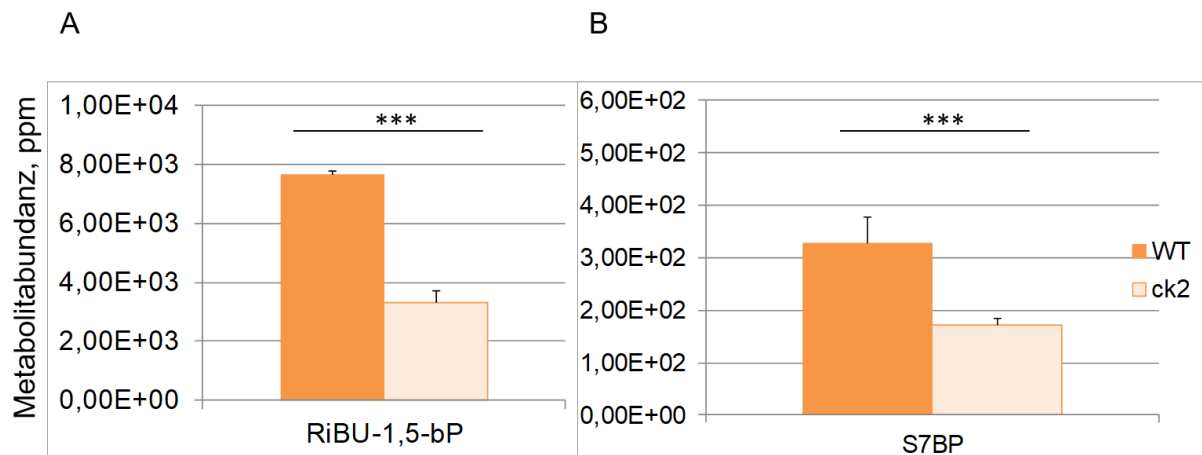


Abbildung 47: Expressionsraten von repräsentativen Metaboliten des Calvin-Zyklus. A: Ribulose-1,5-Bis-Phosphat; B: Sedoheptulose-1,7-Bis-Phosphat (S1,7P) in Wildtyp- und *ck2*-Pflanzen. mittels *t*-Test ermittelten signifikanten Daten sind mit \*\*\* markiert.

Der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Pool ist bei dem Wildtyp um das 2,3-fache höher als bei der Mutante. Genauso verhält es sich bei dem Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat (ca. 2-fach) (Abbildung 47). Weitere Intermediate des Calvinzyklus waren ebenfalls an anderen Stoffwechselwegen beteiligt und zeigten keine signifikanten Unterschiede in Peakintensitäten zwischen Wildtyp und Mutante (zum Beispiel 3-Phosphoglycerat). Unter den in der *ck2*-Mutante gegenüber dem Wildtyp signifikant erniedrigten Intermediaten waren Phosphoenolpyruvat (5,3-fach), Citrat (1,1-fach), Aconitat (1,2-fach), Succinyl-CoA (15-fach) und Succinat (1,7-fach). Fumarat (1,2-fach) und Malat (1,2-fach) zeigten eine gegenläufige Tendenz. Diese Intermediate waren im Wildtyp weniger abundant als in der *ck2*. Der AMP- (1,7-fach) und der GMP-Niveaus (2,1-fach) waren in der Mutante signifikant erhöht (Abbildung 48). Die Spiegel von Mononukleotiden und ADP-ribose lag in der Mutante signifikant höher als im Wildtyp, was auf einen stärkeren Nukleotidabbau hindeutete.

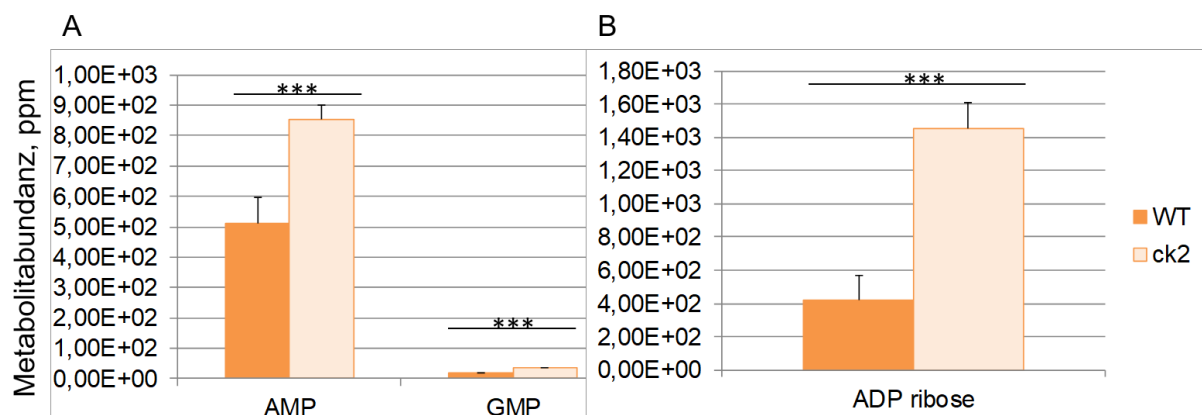


Abbildung 48: Der AMP-, GMP- (A) und ADP-Riboseabundanzen (B) im Wildtyp und in *ck2*-Pflanzen.

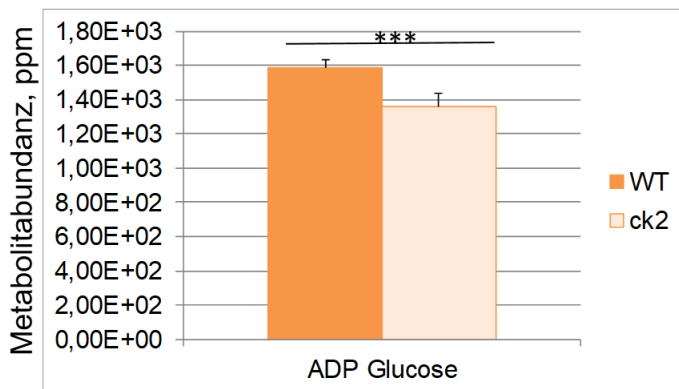


Abbildung 49: Menge an ADP-Glucose als Vorläuferintermediat der Stärkebiosynthese in WT und in ck2-Pflanzen.

In der Abbildung 49 wurde die Änderung des Vorläufermetaboliten für die Stärkebiosynthese, die ATP-Glucose, dargestellt. Außerdem zeigte die Mutante signifikant höhere Mengen an Aminosäuren, die in den Prozess der Photorespiration involviert waren. Die Abbildung 50 verdeutlichte die signifikant höheren Mengen an vorhandenen Aminosäuren Glycin und Serin in der ck2.

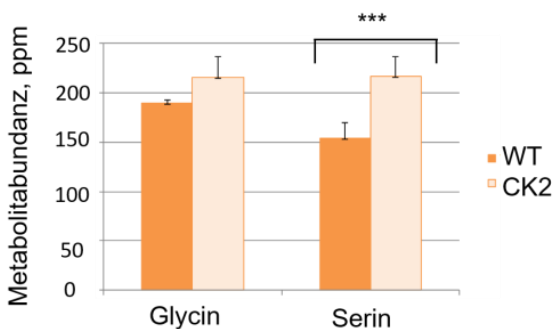


Abbildung 50: Metabolitabundanz von Glycin und Serin in WT (orange) und in ck2-Pflanzen (hellorange).

Die Energieladung beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen aller Adenosylnukleotide und erreicht für den theoretischen Fall, dass nur ATP vorliegt, den Maximalwert 1. Tatsächlich liegt der Wert zwischen 0,75 und 0,95. Die Energieladung der Zelle wurde mit der Formel

$$\text{Energieladung} = \frac{[ATP] + \frac{1}{2} * [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

berechnet und liegt beim Wildtyp mit 0,93 und bei der Mutante mit 0,89 im Normbereich (0,75-0,95) (Atkinson 1968).

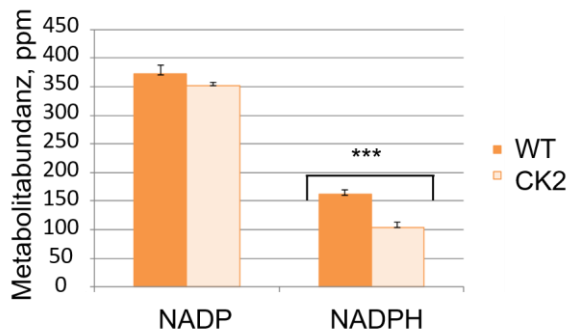


Abbildung 51: Die Abundanz der Reduktionsäquivalenten NADP bzw. NADPH im WT (orange) und der Mutante (hellorange).

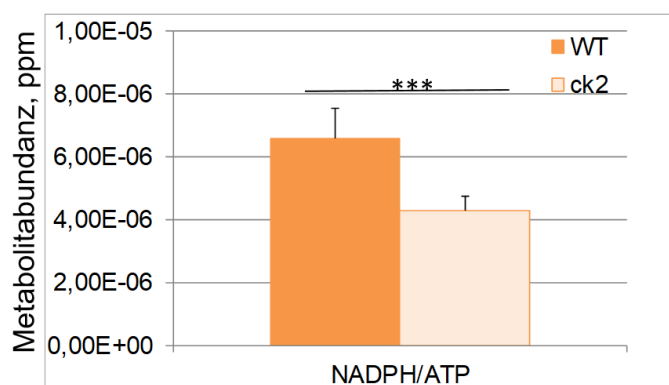


Abbildung 52: Das Verhältnis zwischen NADPH/ATP im Wildtyp (dunkel) und ck2-Linie (hell).

Die Abbildung 52 zeigt signifikante Änderung von NADPH/ATP.

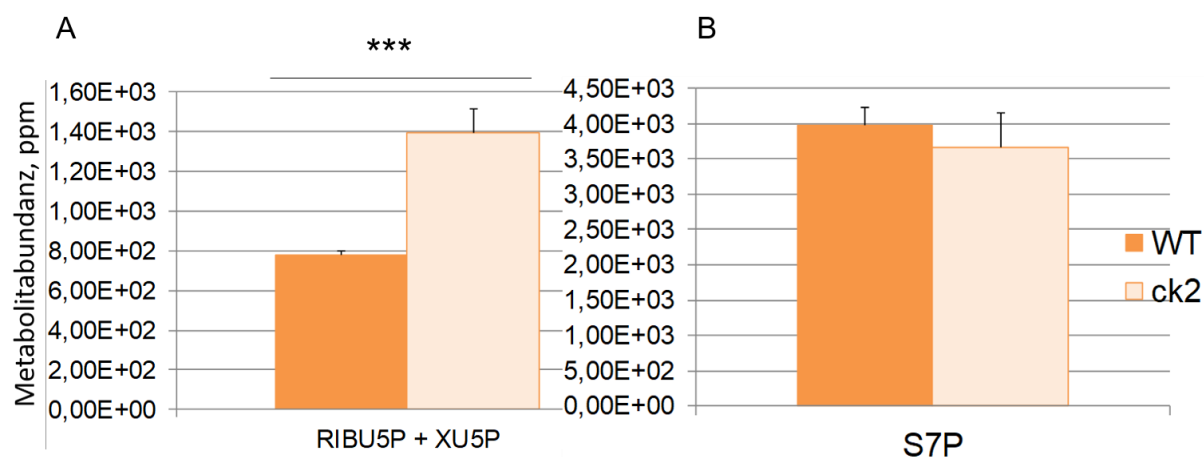


Abbildung 53: Metabolitabundanz von A: Ribulose-5-Phosphat (RIBU5P) und Xylulose-5-Phosphat (XU5P) in Wildtyp (dunkelorange) und ck2 (hellorange) und B: Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) in Wildtyp (dunkelorange) und ck2 (hellorange).

In der Abbildung 53 A wurde die Änderung der Summe der Metabolite Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat zwischen dem Wildtyp und der Mutante verdeutlicht. Die Abundanz der Sedoheptulose-7-Phosphat (Abbildung 53 B) war unverändert. Trotz der nicht variabler ATP-Menge war aufgrund mehrerer Indizien

(geringerer Ribulose-1,5-Bisphosphat-Menge, geringerer Hexosepool, weniger Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat und weniger Reduktionsäquivalente (Abbildung 47, Abbildung 51) davon auszugehen, dass der Calvin-Zyklus gestört war.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der *ck2*-Linie

Die *ck2*-Pflanzen der Linie GK615F11 wurden phänotypisch charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Mutation ausschließlich auf die plastidäre Casein Kinase 2 zurück zu führen ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass es sich bei der Linie GK615F11 um eine *knock-down* und keine *knock-out* Linie handelt. Es scheint logisch, denn vermutlich würde das komplette Fehlen eines so wichtigen Regulationsbausteins weitaus gravierendere Folgen für die Pflanzen haben als nur ein verzögertes Wachstum und eine verspätete Blühphase. Die Komplementation der Mutante führt zu einem WT-ähnlichen Phänotyp, jedoch nicht zu einer vollständigen Komplementation. Für die Überexpression des CK2-Gens wurde der virale 35S Promotor verwendet. Die künstliche Überexpression führte zu einem starken Anstieg der Menge an CK2 in der Pflanze. Die Einschleusung des Gens erfolgt nicht gerichtet, was zu einer möglichen ektopischen Überexpression des Gens führt. Es ist nicht ungewöhnlich, dass diese Art der Expression nicht zu einer kompletten Komplementation führt, in manchen Fällen sogar dazu, dass die Mutante und die komplementierte Pflanze trotz nachgewiesener Überexpression denselben Phänotyp haben (Kiba *et al.*, 2004). In Fall der CK2 jedoch wurde eine 80 %ige phänotypische Komplementation nachgewiesen. Die für die Experimente verwendete Mutante GK615F11 hat neben der T-DNA Insertion im Locus der plastidären CK2 (At2G23070) noch eine weitere T-DNA Insertion im Locus der cytosolischen CK2 (At2G23080). Die Loci sind benachbart und um sicher zu stellen, dass die phänotypischen Auswirkungen, wie die Vermutung war, auf die plastidäre CK2 zurück zu führen sind, wurden mehrere quantitative *real-time*-Polymerase-Ketten-Reaktion-Experimente durchgeführt. Das Ergebnis überraschte, denn es handelte sich um eine *knock-down* und keine *knock-out* Mutante. Die Expression des Gens für die plastidäre CK2 beträgt etwa 15 % des Wildtypsniveaus. Der Expressionslevel der cytosolischen CK2 liegt bei der Mutante auf dem Niveau des Wildtyps. Daraus wird geschlossen, dass die beobachteten Veränderungen des Phänotyps und des Wachstumsverhalten verschiedener pflanzlicher Organe auf die Mutation im Gen der plastidären CK2 zurück zu führen sind. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit der 2014 publizierten phänotypischen Beschreibung dieser Mutation (Wang *et al.*, 2014). Laut Wang hatte die Mutation weder einen Einfluß

auf die Rosettengröße noch die Wurzellänge. Betrachtet man die bisher veröffentlichten bekannten Einflußbereiche der CK2 in der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*, erschien es nahezu unlogisch, dass so ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung keine Auswirkung auf die äußere Entwicklung der Pflanze hat. Jedoch erfolgte die Charakterisierung im Gegensatz zu Wang von den auf Erde gewachsenen Pflanzen, wobei es möglich und sogar sehr wahrscheinlich ist, dass durch optimale Nährstoff-, Mineralstoff- und Vitaminzufuhr, die Unterschiede im Wachstum auf  $\frac{1}{2}$  *Murashige-Scoog*-Medium nicht so ausgeprägt sind und die vermeintliche Diskrepanz damit begründet ist.

## 5.2 Komplementationslinie als Wiedherstellung des Phänotyps

Die CK2 kann nicht mit klassischen Proteinkinasen verglichen werden, die nur sehr spezifisch an- und ausgeschaltet werden und nur zu bestimmten Schritten der Signalkaskaden eine Rolle spielen. Die CK2 ist konstitutiv aktiv und scheint eine globale Rolle in der Zelle zu beherrschen, wo sie in einer Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse, wie Expression der Haushaltsgene, RNA Synthese, Proteinsynthese und Proteindegradation, Differenzierung, Apoptose, Thermotoleranz involviert ist (Guo *et al.*, 2001; Padmanabha *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 2002; Litchfield 2003; Wang *et al.*, 2014). Die meisten identifizierten Substrate sind nukleäre Proteine, die in die DNA/RNA-Assoziation involviert sind oder zelluläre Proteine, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Meggio und Pinna, 2003). Es wäre wenig sinnvoll gewesen ihre Wirkungsweise in Bezug auf eine einzelne Funktion zu untersuchen. Daher wurde entschieden die Mutation zu kompensieren, um anschließend mittels modifizierter CK2 die Proteinkomplexe, samt möglichen Interaktionspartnern zu isolieren. Ein C-terminaler TAP-*tag* wurde an die rekombinante CK2 angefügt und dieses Konstrukt anschließend in die *ck2*-Pflanzen transferiert. Die Verwendung von TAP-*tag* Proteinen zur Isolierung der Proteinkomplexe ist eine interessante Strategie, wenn man ein bestimmtes Protein charakterisieren und seine Interaktionspartner bestimmen möchte (Andrès *et al.*, 2011). Die Einfachheit und schnelle Handhabung der TAP-Strategie gepaart mit den Verbesserungen der Techniken der Massenspektrometrie machen diese Methode unerlässlich bei der Identifikation von Interaktionspartnern der Proteinkomplexe. Das generierte Konstrukt erlaubte theoretisch schnell und relativ kostengünstig die überexprimierte Kinase samt ihrer Interaktionspartner über den TAP-*tag* zu isolieren. Trotz mehrmaliger Versuche und Veränderungen der experimentellen Parameter war der

Nachweis der CK2 und der Interaktionspartner erfolglos. Die phänotypische Komplementierung war jedoch erfolgreich. Durch die Einführung des CK2-TAP-Konstruktes konnte eine 80 %ige Rückkehr zum Wildtypphänotyp unter Standardlichtbedingungen beobachtet werden (Kurztag, Lichtstärke 120  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ). Es wurde darauf verzichtet die perfekten Bedingungen für das Wachstum der komplementierten Pflanzen zu suchen. Ein *shift* Richtung Blau- oder Rotlicht wäre denkbar gewesen (Rubio V *et al.*, 2005). Sowohl die Rosettengröße als auch die Länge der Wurzel war beinahe auf dem Wildtypniveau. Auch die quantitative *real-time*-PCR zeigte ein Expressionsniveau von 80 % der plastidären CK2. Also eine Verfünffachung des Niveaus der Mutante. Die Anreicherung der TAP-CK2 mittels Heparin-Sepharose brachte jedoch nicht die erwünschten Ergebnisse. Vermutlich führt die Größe des TAP-tags dazu, dass die Faltung der ca 40 kDa großen Kinase beeinträchtigt wird und somit die Bindung des Tap-tags an die IgG-Sepharose nicht erfolgen kann. Eine Vermutung ist außerdem, dass die CK2 trotz ihrer vielfältigen Funktionen im Plastiden und einer sehr wichtigen Rolle in vielen zellulären Prozessen in sehr geringen Mengen vorkommt, so dass der alleinige Nachweis der CK2 extrem schwierig ist. Der Nachweis der CK2 mittels schwerer Peptide brachte jedoch den gewünschten Erfolg. Zwei der vier Peptide konnten in den TAP-CK2 Pflanzen eindeutig nachgewiesen werden (siehe Anhang). Trotz der misslungenen Extraktion der TAP-CK2 und ihrer Interaktionspartner gelang die Generierung der TAP-Pflanzen und somit wurden weiteren Untersuchungen des Phosphoproteoms der TAP-Pflanzen möglich, was in Form von gerichteten Phosphoproteom-Analysen gelang.

### **5.3 Höherer Phosphorylierungsgrad in der Mutante. Ein Paradoxon oder logische Folge der Mutation?**

Die durchgeführten vergleichenden Analysen des Phosphorylierungsstatus der *ck2*-Linie und des Wildtyps sind eine verbreitete Methode zur Identifizierung neuer Kinasesubstrate und beruhen auf der Annahme, dass die Substrate einer Kinase in der Mutante in geringerem Maße phosphoryliert werden als im Wildtyp. Ergänzend dazu wurde nach der Generierung und Charakterisierung der komplementierten Linie (TAP-CK2) geprüft, ob der Phosphorylierungsstatus der vermeintlichen Kinasesubstrate in der komplementierten Linie wiederhergestellt wurde (gerichtete Phosphoproteom-Analyse). Die vielfältigen Untersuchungen ergaben, dass es ein weitaus engeres Wechselspiel zwischen der CK2 und ihren Substraten gibt und die alleinige Tatsache des *knock-downs*

in der *ck2*-Pflanzen keine Garantie für eine Reduzierung der Phosphorylierung darstellt. Einige mögliche Substrate der CK2 wiesen in der Mutante einen höheren Phosphorylierungsgrad auf als im Wildtyp. Die erhöhten detektierten Intensitäten in den *ck2*-Mutanten wurden in dem höheren Phosphorylierungsgrad der *ck2*-Pflanzen nach Zugabe rekombinanter CK2 in den radioaktiven Kinaseassays beobachtet. Alle als Substrat der CK2 betrachteten Phosphoproteine besaßen für die CK2 Phosphorylierung charakteristische saure Konsensussequenz.

Mit etwa 720 mittels ungerichteten Phosphoproteom-Analysen ermittelten phosphorylierten Peptiden war die Anzahl beim Wildtyp und der *ck2*-Mutante ähnlich. Auffällig war jedoch die höhere Anzahl an Phosphopeptiden die ausschließlich beziehungsweise mit höherer Intensität in der *ck2*-Mutante detektiert worden sind. Einige Phosphopeptide von Phosphoproteine, die guten Kandidaten für Substrate der CK2 darstellten, wurden in der *ck2*-Mutante mit höherer Phosphorylierungsintensität gefunden. Darunter waren Fibrillin (AT4G04020.1) (jedoch nur in der ungerichteten Proteom-Analyse), Transketolase (AT3G60750.1), *state transition 7* (STN7 (AT1G68830.1)), ein Phosphopeptid des Alb3 (AT2G28800.1) und Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (RBCL (ATCG00480.1)). Eine Erklärung dieses scheinbaren Paradoxons ist die Überkompensation. Sie wurde vor 30 Jahren mit solchen Folgen, wie erhöhtes Blühverhalten und mehr Frucht- und Samenproduktion nachgewiesen (Paige und Whitham, 1987; Stowe *et al.*, 2000). Während diese Beobachtung zunächst sehr kontrovers diskutiert wurde und paradox zu sein schien, wurden Beweise für die tatsächlich vorhandene Überkompensationen in verschiedenen Pflanzenspezies erbracht (Lennartsson *et al.*, 1997; Siddappaji *et al.*, 2013). Obwohl die Ökologiekomponente der Überkompensation gut in den oben erwähnten Veröffentlichungen untersucht wurde, blieben ihre physiologischen und genetischen Grundlagen bis heute weitestgehend unerforscht. Nun stellte sich die Frage, ob die Überkompensation der restlichen CK2 der *knock-down* Linie für den höheren Phosphorylierungsgrad der Mutante verantwortlich sein könnte. Warum zeigte die Mutante ein schwächeres Wachstums- und Entwicklungsverhalten? Eine mögliche Folge des CK2 *knock-downs* könnte sein, dass nun eine andere Kinase, die für die Aktivierung vorgesehene Phosphatgruppe erhalten würden. Die Folge wäre eine ektopische Phosphorylierung von Substraten. Jedoch würden auch die Proteine phosphoryliert werden, die gar nicht phosphoryliert werden sollen. Ein indirekter Beweis für diese These stellt die Tatsache dar, dass in der *ck2*-Linie zwar mehr exklusiv phosphorylierte Peptide



detektiert wurden als im Wildtyp (36 in der Mutante *versus* 20 im Wildtyp). Von den detektierten jedoch nur sehr wenige die für die Phosphorylierung durch CK2 nötige saure Erkennungssequenz trugen (fünf in der Mutante, jedoch acht im Wildtyp). Da die Phosphorylierung selbst einen sehr stark regulierten Prozess darstellt, könnte nun gemutmaßt werden, dass nicht das Fehlen von plastidärer CK2 direkt für den höheren Phosphorylierungsgrad beziehungsweise für den starken Phänotyp verantwortlich ist, sondern der Anstieg der Phosphorylierungen durch andere Kinasen.

#### **5.4 Metabolitverteilung in der pflanzlichen Zelle**

Besonders herausfordernd während der Arbeit mit den Metaboliten war die Tatsache, dass nur die wenigsten reaktions- oder kompartimentspezifisch sind (zum Beispiel Sedoheptulose-1,7-bisphosphat und Ribulose-1,5-bisphosphat). Aufgrund der Komplexität der Stoffwechselwege ist es schwierig unterschiedliche Metabolite separat zu betrachten, es sei denn sie kommen ausschließlich in einem einzigen Stoffwechselweg und Kompartiment vor. Die Verteilung einiger Metabolite innerhalb einer Pflanzenzelle wurde von (Szecowka *et al.*, 2013) untersucht und ist in der Tabelle 34 zusammengefasst.

## Diskussion

Tabelle 34: Metabolitverteilung in unterschiedlichen Kompartimente der pflanzlichen Zelle nach (Szecowka et al., 2013). Es wurde angenommen, dass das 2PGA (2 Phosphoglycerat) nur im Cytosol vorkommt und seine Menge 10% der 3PGA-Menge darstellt. Subzelluläre Verteilung (%) wurde unter Verwendung eines 3 Kompartimenten Modells erstellt (Plastid, Cytosol, Vakuole). Bei mit "a" markierten Metaboliten wurde ein 2-Kompartimenten Model benutz. n.d. nicht definiert.

Metabolit	Konzentration (nmol/gFW)	Plastid (%)	Cytosol (%)	Vakuole (%)
3PGA <sup>a</sup>	200 ± 45	44	56	0
2PGA <sup>a</sup>	20 ± 4.5	0	100	0
ADPG <sup>a</sup>	0.55 ± 0.05	100	0	0
DHAP <sup>a</sup>	2.7 ± 0.6	23	77	0
F6P <sup>a</sup>	86.4 ± 14.6	34	66	0
FBP <sup>a</sup>	8.9 ± 2.3	70	30	0
G1P <sup>a</sup>	11.7 ± 2.4	8	92	0
G6P <sup>a</sup>	173 ± 51	17	83	0
RuBP <sup>a</sup>	46.7 ± 8.2	83	17	0
S7P <sup>a</sup>	28.0 ± 5.4	82	18	0
SBP <sup>a</sup>	9.6 ± 3.0	75	25	0
UDPG <sup>a</sup>	35.7 ± 5.7	0	100	0
R5P <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2	49	51	0
X5P+Ru5P <sup>a</sup>	8.7 ± 2.6	100	0	0
Suc6P <sup>a</sup>	0.82 ± 0.36	0	100	0
PEP <sup>a</sup>	52.5 ± 9.9	6	94	0
Gly	543 ± 59	28	33	39
Glycerate	169 ± 65	31	47	22
Ser	4,265 ± 326	36	22	42
myo-inositol	922 ± 108	66	0	34
Suc	3,432 ± 167	19	31	50
Trehalose	20.8 ± 3.0	50	0	50
Glu	3,682 ± 1,042	30	42	28
Malate	1,820 ± 547	0	0	100
2-Oxoglutarate	63.1 ± 18.8	6	35	59
Pyruvate	99.2 ± 35.6	24	31	45
Val	139 ± 16	32	0	68
Ile	38.9 ± 4.5	33	0	67
Pro	641 ± 90	31	24	45
Thr	459 ± 58	42	0	58
Fumarate	1,154 ± 47	0	0	100
Asp	1,050 ± 346	19	46	35
Phe	53.1 ± 6.9	48	0	52
Asn	380 ± 25	30	17	53
Fru	1,458 ± 30	0	12	88
Glc	2,669 ± 475	12	23	65
Arg	164 ± 18	42	0	58
Tyr	9.8 ± 1.2	45	0	55
Citrate	1,916 ± 505	0	0	100
Shikimate	35.9 ± 7.6	37	22	41
Succinate	84.0 ± 48.2	4	17	79
Ala	228 ± 24	16	14	70
Gln	2,349 ± 177	11	0	89
Nitrate	224,000 ± 4,100	0	0	100
Aconitate	14.5 ± 5.5	0	0	100
Isocitrate	33.5 ± 3.6	0	0	100
Lys	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maltose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Met	9.9 ± 1.4	42	13	45

Aus der Tabelle 34 wird ersichtlich, dass mehrere Intermediate sowohl in den Chloroplasten, als auch im Cytosol vorkommen. Die zentrale Frage in Bezug auf die

Metabolite war: welchen Einfluß die Mutation im CK2-Gen auf den Kohlenhydratstoffwechsel der mutanten Pflanzen hat.

## **5.5 Der *knock-down* der CK2 führt zu veränderter Dunkelreaktion der Photosynthese.**

Die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus spielt während der Pflanzenentwicklung und im Pflanzenwachstum eine entscheidende Rolle. Während der Photosynthese wird Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt. Diese Energie wird teilweise genutzt, um atmosphärisches Kohlenstoffdioxid über den Calvin-Zyklus zu reduzieren (Dunkelreaktion) und später in Zucker umzuwandeln. Der in den grünen Pflanzen ablaufende Calvin-Zyklus wird also durch die über die Photosynthese bereitgestellte Energie angetrieben und ist für die Synthese von Monosacchariden (auch in phosphorylierter Form) von großer Bedeutung. Die Entscheidung, besonders die Dunkelreaktion zu untersuchen, entstand aus der Tatsache heraus, dass zwei Intermediate dieses Stoffwechsels spezifisch nur in dem Calvin-Zyklus vorkommen, Ribulose-1,5-bisphosphat und Sedoheptulose-1,7-bisphosphat. Deshalb wurden die Abweichungen dieser Intermediate auf den direkten Einfluß der Mutation zurückgeführt. Auf die Bindung des Kohlenstoffdioxids folgt die Carboxylierung des Ribulose-1,5-bisphosphats durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (Rubisco) zu 2 Molekülen 3-Phosphoglycerat (3PG). Wie vorhergehenden Arbeiten und die anderer Kollegen zeigten, wurde die Rubisco-Aktivase als ein Substrat der CK2, mittels CHIP und ungerichteter beziehungsweise gerichteter Phosphoproteom-Analysen, bestätigt (*Kim et al.*, 2016; Schönberg *et al.*, 2014). Die Rubisco-Aktivase aktiviert die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco), in dem es an die Rubisco gebundenens Ribulose-1,5-bisphosphat unter ATP-Hydrolyse entfernt (Salvucci *et al.*, 1986). Die Menge an phosphorylierter Form der Rubisco-Aktivase und des umsetzenden Ribulose-1,5-bisphosphat ist in der Mutante geringer. Daher wurden auch signifikante Änderungen anderer Intermediate des Calvin-Zyklus erwartet. Dies wurde am deutlichsten auch für Sedoheptulose-1,7-bisphosphat, dessen Konzentration in der Mutante signifikant geringer war als im Wildtyp. Die Folgereaktion im Calvinzyklus ist die Umsetzung von Sedoheptulose-1,7-bis-Phosphat (S1,7BP) zu Sedoheptulose-7-phosphat (S7P). Die Abundanz von S7P im Wildtyp und der Mutante war unverändert. Die Verteilung des S7P lag mit 82 % in Plastiden (Szecowka *et al.*, 2013). Das Ergebnis der unveränderten S7P-Abundanz (Metabolomanalyse) korreliert mit den Ergebnissen der *Phosphoproteomics*,

## Diskussion

wo ein höherer Phosphorylierungsgrad der Transketolase in der *ck2*-Linie gemessen wurde. Die Regenerierung von Ribulose-1,5-bisphosphat, welche durch die Rubisco-Katalyse verbraucht wird, wird durch Transketolase (AT3G60750.1) katalysiert. Im Rahmen der Phosphoproteomstudien konnte die Transketolase in den engen Kreis der CK2-Substrate aufgenommen werden. Die chloroplastidäre Transketolase stellte ein Schlüsselenzym des Kohlenstoffmetabolismus dar, denn ihre Rolle ist sowohl im Calvin-Zyklus als auch im oxidativen Pentosephosphat-Weg von großer Bedeutung (Murphy und Walker, 1982). Während des Calvin-Zyklus katalysierte die Transketolase zwei regenerative Reaktionen: Die Bildung von Xylulose-5-phosphat und Erythrose-4-phosphat aus Fruktose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat und die Bildung von Xylulose-5-phosphat und Ribulose-5-phosphat aus Sedoheptulose-7-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (Hunter, 1995). Der Level der Transketolase war in der *ck2*-Mutanten Linie leicht erhöht. Es wurde ebenfalls ein signifikant höherer Spiegel an Xylulose-5-phosphat und Ribulose-5-phosphat in *ck2*-Linie gemessen, welche als Summe gemessen ausschließlich in Plastiden vorkommen. Somit konnte die Erhöhung des Spiegels der Xylulose-5-phosphat und Ribulose-5-phosphat eindeutig auf die höhere Phosphorylierung von Transketolase zurückgeführt werden. Der unveränderte Status der Sedoheptulose-7-phosphats kann nicht eindeutig erklärt werden. Somit konnte zwar die Vermutung der Transketolase als CK2-Substrat untermauert werden.

Die Menge an 3-Phosphoglycerat (3PG) war nicht verändert. In der Arbeit von (Szecowka *et al.*, 2013) wurde gezeigt, dass die Verteilung des 3-PG in der Zelle mit 56 % auf der Seite des Cytosols liegt. Darüber hinaus ko-eluierten 3-PG zusammen mit 2-PG (2-Phosphoglycerat), welches auch massenspektrometrisch nicht von 3-PG unterscheidbar ist. Im Gegensatz zu 3-PG liegt 2-PG in Blättern von *Arabidopsis* zu 100 % im Cytosol Form vor. Daher ist es durchaus plausibel, dass ein Teil der Abundanz von 3-PG durch 2-PG maskiert wurde und das tatsächliche Level von 3-PG nicht sauber von 2-PG unterscheidbar ist. Somit wurde ein deutlicher Einfluß der Mutation auf die Metabolite des Calvin-Zyklus und damit auf den Zyklus selbst gezeigt. Üblicherweise würde eine Herabsetzung des Calvinzyklus zu einer Verringerung der Stärkebiosynthese führen. Stärke stellte eine der wesentlichen Speicherformen für Kohlenhydrate in der Pflanze, neben der Saccharose, dar. Die Messungen der Konzentrationen an ADP-Glucose als Stärkevorläufer ergibt eine signifikante Herabregulierung in der *ck2*-Linie. Diese Fragestellung wurde jedoch nicht weiter untersucht.

## 5.6 Einfluß des *knock-downs* auf die Lichtreaktion der Photosynthese

Während der sogenannten Lichtreaktion der Photosynthese werden aus der Lichtenergie stammenden energiereichen Elektronen genutzt um NADPH zu produzieren. Die unregelmäßige Anregung zwischen den Photosystemen I und II wird in einem komplexen Prozess der „*state-transition*“ unter anderem durch die *state transition 7* (STN7) reguliert. Diese Kinase stellt ein weiteres potentiell Substrat der Casein Kinase 2 dar. Es wurde postuliert, dass NADPH zusammen mit *state transition 7* (STN7) in den Prozess der „*state-transition*“ involviert ist, das die Schwankungen in der Anregung zwischen den Photosystemen I und II ausgleicht (Rochaix *et al.*, 2012). Für die Regulation der *state transition 7* gibt es zwei verschiedene Mechanismen, über den Plastochinon-Pool und über das Thioredoxin *f*. Die *state transition 7* wird über das stromale Verhältnis des Redoxstatus im Chloroplasten kontrolliert (Johnson, 2018). Das NADPH-Level in der *ck2*-Linie ist signifikant erniedrigt, so wie das Verhältniss zwischen NADPH/ATP. Johnson stellte 2018 die Hypothese auf, nach dem hohen Verhältnis von NADPH/ATP zu Reduktion von Thioredoxin *f* führt, was die Reduktion eines Motivs in der stromalen Domäne des *state transition 7* zur Folge hat und damit die Inaktivierung von *state transition 7*. Geringes NADPH/ATP Verhältnis führt zur Oxidation von Thioredoxin *f* und zur Aktivierung von *state transition 7*. Tatsächlich wurden in den Phosphoproteomstudien *state transition 7* in phosphorylierter Form detektiert, wobei die Detektionsstärke in der *ck2*-Linie höher war als im Wildtyp. Die gerichtete Analyse der komplementierten Linie verzeichnete äquivalent eine geringere Detektionsstärke im Wildtyp als in der *ck2*-Linie. Dies steht jedoch auch mit der postulierten These der STN7-Regulation durch den Redoxstatus des Plastoquinon-Pools im Einklang (Rochaix *et al.*, 2012). Es wurde postuliert, dass *state-1*-Bedingungen der „*state-transition*“ zu einem geringeren Level an STN7 führten (Willig *et al.*, 2011). Umgekehrt würden die Bedingungen, die *state-2* begünstigen, (im Fall der *ck2*-Linie geringerer Pool an Reduktionsäquivalente NADP und NADPH), zu einem Anstieg der STN7 in *ck2* führen, was die Ergebnisse dieser Arbeit mit gerichteten und ungerichteten Analysen belegen.

Die *state transition 7* wird am C-terminalen Threoninrest phosphoryliert, welches die saure Erkennungssequenz der Casein Kinase 2 Substrate trägt (Reiland *et al.* 2009). Funktionale Analysen zeigen, dass die Phosphorylierung der *state transition 7* keine Auswirkung auf die katalytische Aktivität oder regulatorische Eigenschaften haben (Willig *et al.* 2011). Einzig die Stabilität der *state transition 7* unter den *state 2* Bedingungen,

während die Kinase aktiv ist, wird durch die Phosphorylierung am C-terminalen Ende beeinflusst (Willig *et al.* 2011).

Es könnte gemutmaßt werden, dass die Stabilität der STN7 in der *ck2*-Linie aufgrund des höheren Phosphorylierungsstatus erhöht ist. *State transition 7* ist jedoch nicht nur an der kurzfristigen Anpassung an veränderte Lichtbedingungen beteiligt, sondern auch in die langfristige Anpassung durch die Regulation der plastidären Genexpression involviert. Durch vergleichende Phosphoproteom-Analysen mit *stn7*-Mutanten konnten transkriptionell aktives Chromosom 16, das ribosomale Protein S7 und Ribonucleoprotein 29 als potentielle Substrate der STN7, die an der Genexpression beteiligt sind, identifiziert werden (Schonberg und Baginsky 2012, Schonberg *et al.* 2017), wobei die genaue Interaktion mit *state transition 7* noch untersucht werden muss.

### 5.7 Höhere Photorespiration als Folge des CK2 knock-downs

Neben der Carboxylasereaktion während der Kohlenstoffdioxidfixierung in der Dunkelreaktion des Calvin-Zyklus katalysiert die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) auch eine Oxygenasereaktion, deren Reaktionsgeschwindigkeit jedoch 4-mal niedriger ist als die Carboxylierungsreaktion.

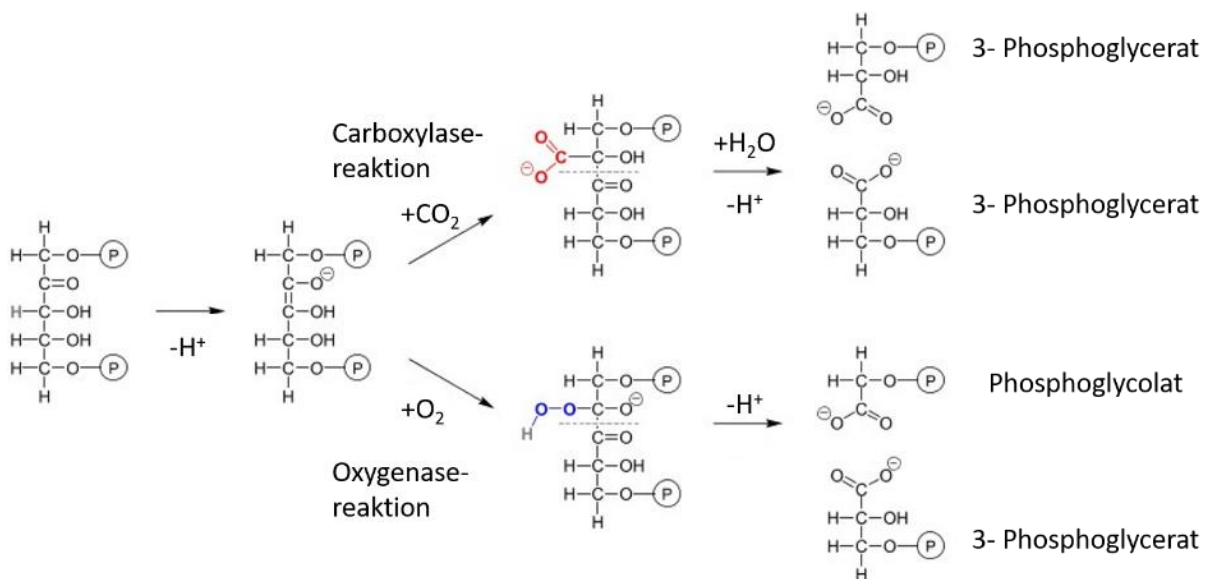


Abbildung 54: Carboxylase-Reaktion und Oxygenase-Reaktion der Rubisco. (frei nach Stryer Biochemie S. 632).

Die Abbildung 54 verdeutlicht die durch Rubisco katalysierten Reaktionen. Nach der Entstehung des reaktiven Endiolats gibt es zwei Möglichkeiten: der Weg des Calvin-Zyklus (Bindung von CO<sub>2</sub> und Spaltung in 2 Molekülen 3-Phosphoglycerat (Carboxylase-Reaktion) oder Bindung von O<sub>2</sub> und anschließende Freisetzung von einem Molekül 3-Phosphoglycerat und einem Molekül Phosphoglykolat (Oxygenase-Reaktion)). Das

Phosphoglykolat ist giftig für die Zelle und wird in Peroxisomen zu Glyoxylat umgewandelt. Diesen Prozess nennt man Photorespiration. Das Glyoxylat wird im Mitochondrium durch Aminierung zu Glycin verstoffwechselt. Zwei Moleküle Glycin bilden unter  $\text{CO}_2$ -Freisetzung und Abspaltung von einem Ammonium-Ion Serin. Erhöhte Niveaus an Glycin und Serin in *ck2*-Mutante legen die Schlussfolgerung nahe, dass der Fluss über die Photorespiration in der Mutante höher ist als im WT. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboxylase- und Oxigenasereaktion von Rubisco im WT gegenüber der *ck2* sank. Photorespiration setzt auf dem Wege des 3-PG-Recyclings und der Serin-Biosynthese Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) frei und erzeugt demnach oxidativen Stress in Chloroplasten. Es konnten weitere Nachweise dafür gesammelt werden, dass die *ck2*-Mutante unter Stress steht.

### **5.8 *ck2* Knock-down Mutante unter Stress**

Weiteren Hinweis darauf, dass die *ck2*-Mutante unter Stress steht, liefert Fibrillin, welches sowohl in der gerichteten- als auch der ungerichteten- Analysen sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp detektiert wurde. In der ungerichteten-Analyse war dessen Phosphorylierungsgrad in der Mutante jedoch höher als im Wildtyp. In der gerichteten Analyse lag die phosphorylierte Form von Fibrillin in der Mutante jedoch mit geringer Intensität vor. Fibrillin ist bereits als *in-vitro*-Substrat der *ck2* beschrieben (Schönberg *et al.*, 2014). Fibrillin ist der am meisten abundante Vertreter der Plastoglobuli (Singh und McNellis, 2011). Plastoglobuli (PG) sind Monolayer und Lipoproteinpartikel, welche wichtige Rollen in der Plastidbiogenese, Seneszenz, Homöostase und in der Reaktion der Chloroplasten auf Stress spielen (Eugeni Piller *et al.*, 2012; Bréhélin *et al.*, 2007). In Chloroplasten sind PGs in der äußeren Membran der Thylakoide angeordnet. Als Antwort auf biotischen und abiotischen Stress, aber auch Entwicklungsänderungen, reagieren die PGs mit Veränderungen ihrer Anzahl und ihres Volumens, wobei die genauen Mechanismen dieser Regulation und Kontrolle nicht verstanden sind (Austin *et al.*, 2006). Viele Hinweise deuten stark darauf hin, dass Fibrillin ein natives Substrat der CK2 sein könnte.

## 5.9 Warum konnte TOC 159 nicht mittels gerichteter Proteomics nachgewiesen werden?

Ob die Photosynthese korrekt abläuft, ist vom Import tausender verschiedener Präproteine in sich entwickelnde Organellen über die chloroplastidäre Proteinimportmaschinerie abhängig. Einen Teil dieses Apparates bilden der proteindirigierende Kanal TOC75 und die Importrezeptoren TOC33 und TOC159 (Agne und Kessler, 2009). Alle Mitglieder der TOC159-Familie besitzen die einzigartige tripartite Struktur. Diese besteht aus der N-terminalen sauren Domäne (A-Domäne) und einer zentralen GTPase-Domäne (G-Domäne), beide im Cytosol. Vervollständigt wird der Komplex durch die C-terminale Anker-Domäne (M-Domäne), welche geschützt vor Proteolyse mit der äußeren Membran des Chloroplasten durch einen unbekannt Mechanismus assoziiert ist (Hirsch *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2004; Lung und Chuong, 2012). Aus der Struktur des Komplexes wird ersichtlich, dass die A-Domäne von TOC 159 weit in das Cytoplasma hinausragt (Abbildung 55). Somit kann die Phosphorylierung des TOC 159-Komplexes durch die chloroplastidäre CK2 ausschließlich an der M-Domäne stattfinden. Die Präparation der Chloroplasten hat ihre enorme Beanspruchung zur Folge. Es ist möglich, dass die A-Domäne des TOC159-Komplexes sehr empfindlich ist und während der Präparation von dem Rest des Komplexes abgetrennt wurde, was die Phosphorylierung unmöglich machte.

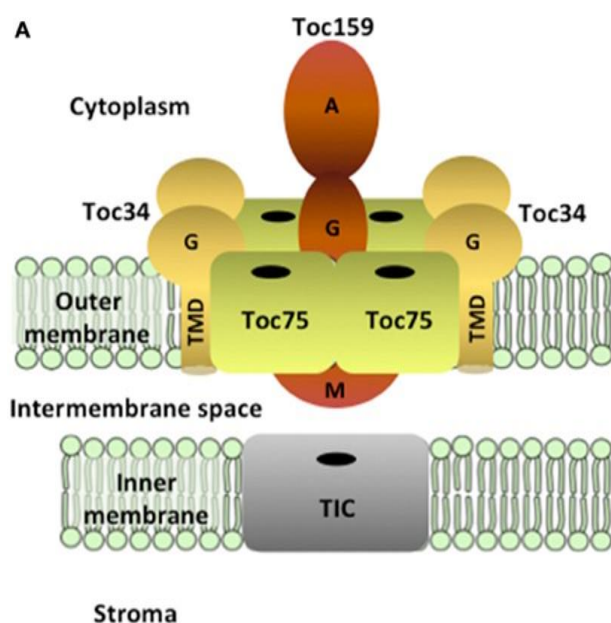


Abbildung 55: schematischer Aufbau des TIC/TOC-Komplexes. (nach Richardson *et al.*, 2014)



## **5.10 Inner membrane Protein Albino 3 (Alb3) als mögliches Substrat der CK2?**

Das Protein, *inner membrane protein Albino 3* (Alb3), ist essentiell für die Intergration von Proteinen des Lichtsammelkomplexes in die Thylakoidmembran. Durch eine mögliche Phosphorylierung von Alb3 durch die plastidäre CK2 könnte die Brücke zwischen der Regulation der Genexpression auf der einen und der Assemblierung der Thylakoidmembran auf der anderen gebaut werden (Schönberg *et al.*, 2014). Der Unterschied der auf der *inclusion list* enthaltenden Peptide von Alb 3 betrug 4 Aminosäuren. Beide dieser Phosphopeptide wurden bereits an unterschiedlichen Stellen (T409, S416, S418, S420 und S424) (Reiland *et al.*, 2009). Alb3 wurde bei den CHIP-Experimenten sowohl von der nativen, als auch von der rekombinanten CK2 phosphoryliert. Mit den generierten Alb3-Phosphorylierungsmutanten (S416A, S418A, S424A) konnte S424 als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Beide detektierten Alb3 Phosphopeptide wurden gemeinsam betrachtet, da es sich um dieselbe potentielle Phosphorylierungsstelle der plastidären CK2 handelt. Eigenartigerweise wurde die Intensität, trotz der Detektion in allen Replikaten, im Wildtyp nur ein Mal für das eine Phosphopeptid und zwei Mal für das andere Phosphopeptid angegeben. Somit lies sich die höhere Phosphorylierungsintensität in der Mutante eindeutig auf diese Unstimmigkeit zurück zu führen. Weitere *in-vivo*-Untersuchungen sind nötig um Alb3 eindeutig als Substrat der CK2 zu verifizieren.

## **5.11 Weitere mögliche Substrate der Casein Kinase 2**

Die ATP-Synthase (ATPB) produziert durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat die universelle Energiewährung der Zelle, Adenosintriphosphat (ATP). Das Enzymkomplex (ATPB) wurde bereits 1998 als *in-vitro*-Substrat der CK2 postuliert (Kanekatsu *et al.* 1998). Die ATP-Synthase stellt auch für den Calvin-Zyklus die ATP zur Verfügung. Die ATPB wurde zwar jeweils nur in einem Replikat, jedoch sowohl in der ungerichteter als auch in der gerichteten Analyse in phosphorylierter Form, ausschließlich in der Wildtyp-Linie detektiert. Somit könnte man das in der Thylakoidmembran der Chloroplasten sich befindenden Enzymkomplex ATP-Synthase als *in-vivo*-Substrat der CK2 bezeichnet werden.

Weiteres potentiell Substrate der chloroplastidären CK2 ist ein Protein, das an der plastidären Genexpression beteiligt ist, die Ribonuklease J. Sie verhindert, dass die *antisense*-RNA nach der Transkription akkumuliert, wodurch die ineffiziente Termination

der Transkription ausgeglichen wird (Sharwood *et al.*, 2011). Der chloroplastidäre RNA-Metabolismus stellte ebenfalls einen Prozess der Regulation der Genexpression dar. RNA-*splicing* und -*editing* sind stark von RNA-bindenden Proteinen abhängig, welche nicht in Prokaryoten vorkommen. Diese RNA-bindenden-Proteine enthalten auch Mitglieder der *penta-tricopeptid repeat family* (PPR), welche in Pflanzen stark verbreitet sind und dessen Primärfunktion die Regulation der organellenspezifischen Gene darstellte (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Ein Vertreter dieser Proteine (AT3G49140.1) wurde in phosphorylierter Form, mit dem Phosphopeptid AGGDEsEIDSSQDEK im Wildtyp detektiert. Um jedoch dieses Protein als eindeutiges Substrat der CK2 zu etablieren, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die Ribonuklease J ein natives Substrat der CK2.

Auch das *CP12-domain-containing-protein-1* zeigte einen verringerten Phosphorylierungsstatus in der *ck2*-Linie. Bereits 1997 wurde die Beteiligung des CP12 an der Regulation des Calvin-Zyklus beschrieben (Wedel *et al.*, 1997). CP 12 vermittelt die Bildung eines Proteinkomplexes mit der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Phosphoribunuklease als Reaktion auf veränderte Lichtbedingungen (López-Calcano *et al.*, 2014). In der TAP-*ck2*-Linie zeigt CP12 einen etwas höheren Phosphorylierungsgrad als im Wildtyp. Da jedoch die Genexpression der CK2 unvollständig komplementiert ist, könnte man vermuten, dass diese Tatsache einen Widerspruch darstellt. Jedoch erfolgt die Genexpression der rekombinanten CK2 in der TAP-*ck2*-Linie durch den 35S-Promotor. Es könnte daher sein, dass durch die veränderte Genexpression der CK2 die Regulation der Expression anderer Gene mit beeinflusst wird beziehungsweise der TAP-*tag* die Stabilität der CK2 so beeinflusst, dass ihre *turn-over-rate* verändert war, woraus eine stabilere Wechselwirkung mit den Interaktionspartnern resultierte. Die genaue Rolle der CK2 in der Regulation des CP12 muss weiter untersucht werden.

## 5.12 Einfluß des CK2 *knock-downs* auf das Wurzelphosphoproteom

Im Jahr 2014 erschien eine Metaanalyse der Phosphoproteomdaten in Bezug auf die Kompartimentierung der Phosphorylierungsmotive (van Wijk *et al.*, 2014). Elf der untersuchten Studien nutzten Blätter beziehungsweise die Rosette als Untersuchungsobjekt, jedoch nur eine die Wurzel. Die Arbeit mit den zwei Wochen alten Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* an sich war, aufgrund ihrer Größe herausfordernd. Für

die vergleichende Phosphoproteom-Analyse wurden jedoch noch kleinere GK615F11-Wurzeln untersucht. Obwohl das Vorhandensein der plastidären Kinase CK2 in den Wurzeln nicht beschrieben war, erschien es sinnvoll den möglichen *cross-talk* zwischen den Organen der *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, zumal die *knock-down* Mutation einen ausgeprägten Einfluß auf die Wurzeln der Pflanze hatte. Die Vermutung, CK2 könnte einen Einfluß auf die Signalübertragung über Auxin haben äußerte Moreno-Romero bereits 2008. Auxin gehört zu Pflanzenhormonen und spielt während des Wachstums und der Entwicklung von Pflanzenteilen eine essentielle Rolle (Woodward und Bartel, 2005; Vanneste und Friml, 2009). In den Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* wird die Weiterentwicklung der Chloroplasten aus den Leukoplasten über Auxin-Signalübertragung gehemmt (Overvoorde *et al.*, 2010). Wurzeln, die vom Spross abgetrennt werden fangen an Chloroplasten zu entwickeln. Die beiden sowohl im Wildtyp gefundenen Phosphopeptide AT1G35340.1 und AT4G00630.1 mit der sauren Konsensussequenz, eine ATP-abhängige Protease und ein K<sup>+</sup>-Efflux Antiporter, sind chloroplastidären Ursprungs, wobei der K<sup>+</sup>-Efflux-Antiporter in der Wurzel exprimiert wird. Ein weiteres Indiz für die Existenz einiger Chloroplasten in *ck2*-Wurzeln ist das Vorhandensein der phosphorylierten Form von Lichtsammelkomplex II in der *ck2*-Mutante. Da dieses jedoch nur in einem Replikat detektiert wurde, ist dieser Zusammenhang nicht verlässlich. Eine Hypothese ist hiermit, dass durch die *knock-down*-Mutation im CK2-Gen die Auxininhibierung der Chloroplastenentwicklung in der Wurzel gestört ist. Um diese These zu beweisen sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen der *ck2*-Wurzeln erfolgen. Bei den *ck2*-Wurzeln gefundenen Phosphopeptiden enthielten drei für die Phosphorylierung der CK2 notwendige saure Erkennungssequenz. AT1G15210 (*pleiotropic drug resistance 7*), AT5G08540 (eine Methyltransferase) und AT1G17520 (*Single Myb Histone (SMH) gene family member*). Alle drei werden neben anderen Geweben auch in den Wurzeln exprimiert. Alle drei Phosphopeptide gehören zu den bereits publizierten Phosphopeptiden. Um jedoch ihre Beteiligung am *cross-talk* mit der CK2 zu belegen, müssten weitere experimentelle Nachweise erbracht werden.

Ein in allen drei Replikaten der *ck2*-Linie gefundenes phosphoryliertes Peptid ist das Phosphopeptid der 3-Phosphoglycerat-dehydrogenase (PGDH). Die PGDH ist für die Serinbiosynthese in nicht photosynthetisch-aktiven Geweben der Pflanze verantwortlich (Ho *et al.*, 1999). Ho zeigte, dass die PGDH für die Serinbiosynthese essentiell ist. Ros *et al.* postulierten 2014, dass der Phosphorylierungsweg der Serinbiosynthese einen Link

## Diskussion

zwischen dem Metabolismus und der Entwicklung darstellt. Die höhere Abundanz der phosphorylierten Form an PGDH unterstützt diese These und lässt vermuten, dass die CK2 in diese Form der Synthese regulierend eingreift. Weitere Analysen in Form von vergleichenden Metabolitstudien der Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und *ck2*-Linie, ergänzt um die TAP-*ck2*-Linie, würden einen genaueren Zusammenhang in dieses komplizierte Wechselspiel geben.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel meiner Promotion war es, die CK2 molekularbiologisch zu charakterisieren und die Auswirkungen der Mutation auf den Phänotyp von *Arabidopsis thaliana* zu beschreiben. Außerdem sollte danach die Kompensation der Mutation mittels TAP-Technik erfolgen, was die Charakterisierung der Mutante in Bezug auf ihre Funktion vervollständigen würde. Durch die anschließende Extraktion der Interaktionspartner der CK2 neue Substrate dieser auf der einen Seite sehr abundanten, jedoch in sehr geringen Mengen vorkommenden Kinase bestimmt und dadurch das Verständnis der vielfältigen Prozesse, in die die CK2 involviert ist, verbessert werden.

Die phänotypische Charakterisierung wurde erfolgreich durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Blätter und der Wurzeln sehr stark verlangsamt ist und die Mutante die Größe des Wildtyps nie erreicht. Dennoch werden keim- und wachstumsfähige Samen gebildet. Die CK2 wurde bereits 2013 nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Ausprägung des Phänotyps in den *ck2*-Pflanzen der Linie GK615F11 auf den *knock-down* der Genexpression der plastidären CK2 zurück zu führen und die Genexpression der cytosolischen CK2 unverändert ist.

Die Ziele der Komplementationslinie mittels Generierung eines TAP-tags in der CK2 waren zum einen das Erschaffen eines *rescue*-Phänotyps und zum anderen die Suche nach neuen Substraten der Kinase, um das Verständnis des komplizierten Wechselspiels der Kinase im Chloroplasten einen großen Schritt voran zu bringen. Die Generierung der TAP-Pflanzen hat weiteren Untersuchungen des Phosphoproteoms der TAP-Pflanzen den Weg geebnet. Da die Isolation von CK2-Interaktionspartner mittels der TAP-Strategie nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde die Suche nach neuen Substraten, beziehungsweise die Auswirkungen der Mutation auf die Stoffwechsel der Pflanze, auf andere Weise fortgesetzt.

Das ubiquitäre Vorhandensein der CK2 in der Zelle, leider in sehr marginalen Mengen, machten diese Kinase sehr schwer greifbar. Die nachgeschalteten Anreicherungsschritte führten dazu, dass man zwar in der Lage war die Kinase nachzuweisen, ihre Menge in den Experimenten jedoch nur sehr schwer zu bestimmen ist (mit Ausnahme der Zugabe der rekombinanten CK2). Durch ihr vielfältiges Wirkungsspektrum war ihr jedoch nie eine eindeutige Aufgabe zuordenbar. Die GK615F11, also die T-DNA Insertion im Locus der AT2G23070 führte lediglich zu einem *knock-down* der Expression des Gens für die plastidäre CK2. Trotz sehr starker Auswirkung der Mutation auf den Phänotyp und dem

eindeutigen Rückgang der Genexpression um 80 % ist das Stoffwechselgleichgewicht der Pflanzen weitgehend intakt. Die plastidäre CK2 ist eine hoch konservierte, pleiotrope Ser/Thr-Kinase mit einer Vielzahl an Substraten. (Allende und Allende, 1995; Pinna, 2002; Litchfield, 2003; Meggio und Pinna, 2003). Der starke Pleiotropismus dieser Kinase erklärt auch die konstitutive Aktivität der CK2. Diese beiden Eigenschaften zusammen zeigen, warum die CK2 nicht mit klassischen Proteinkinasen verglichen werden kann, die nur sehr spezifisch an- und ausgeschaltet werden, und nur zu bestimmten Schritten der Signalkaskaden eine Rolle spielen. Die CK2 scheint eine globale Rolle in der Zelle zu beherrschen, wo sie in einer Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse, wie Expression der Haushaltsgene, RNA Synthese, Proteinsynthese und Proteindegradation, Differenzierung, Apoptose und die Thermotoleranz involviert ist (Guo *et al.*, 2001; Padmanabha *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 2002; Litchfield, 2003; Wang *et al.*, 2014). Aus der Vielzahl dieser Funktionen konnten einige gute Kandidaten als CK2 Substrate etabliert und mögliche Zusammenhänge in der Regulation erläutert werden. Zu ihnen gehören Rubisco-Aktivase (RCA), *state transition 7* (STN7), Fibrillin (FIB), *calvin cycle protein 12* (CP12), ATP-Synthase, Transketolase (TKL) und Ribonuklease J (RNJ). Weiterhin konnte der Einfluß der CK2 auf den Kohlenstoffstoffmetabolismus und die Redoxäquivalente der Lichtreaktion gezeigt werden. Es konnte postuliert werden, dass die *ck2*-Pflanzen unter Stress stehen. Um jedoch konkrete Interaktionen der CK2 zu studieren, müsste ein einzelnes Ereignis betrachtet werden, was angesichts der Fülle an Interaktionspartnern auf der einen Seite und ihrer geringen Konzentration im Chloroplasten auf der anderen Seite sehr schwierig werden könnte. Es ist zu vermuten, dass gerade aufgrund der vielfältigen Rollen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse die Aufgaben der CK2 im Fall ihrer Abwesenheit zum Teil durch andere Kinasen übernommen werden. Vergleichende Metabolitanalysen der Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp, *ck2*- und TAP-*ck2*-Linien würden einen genaueren Anblick in den Zusammenhang zwischen dem Metabolismus und Phosphorylierungsstatus der Wurzeln und die Rolle der CK2 darin, geben.

## 7 Anhang

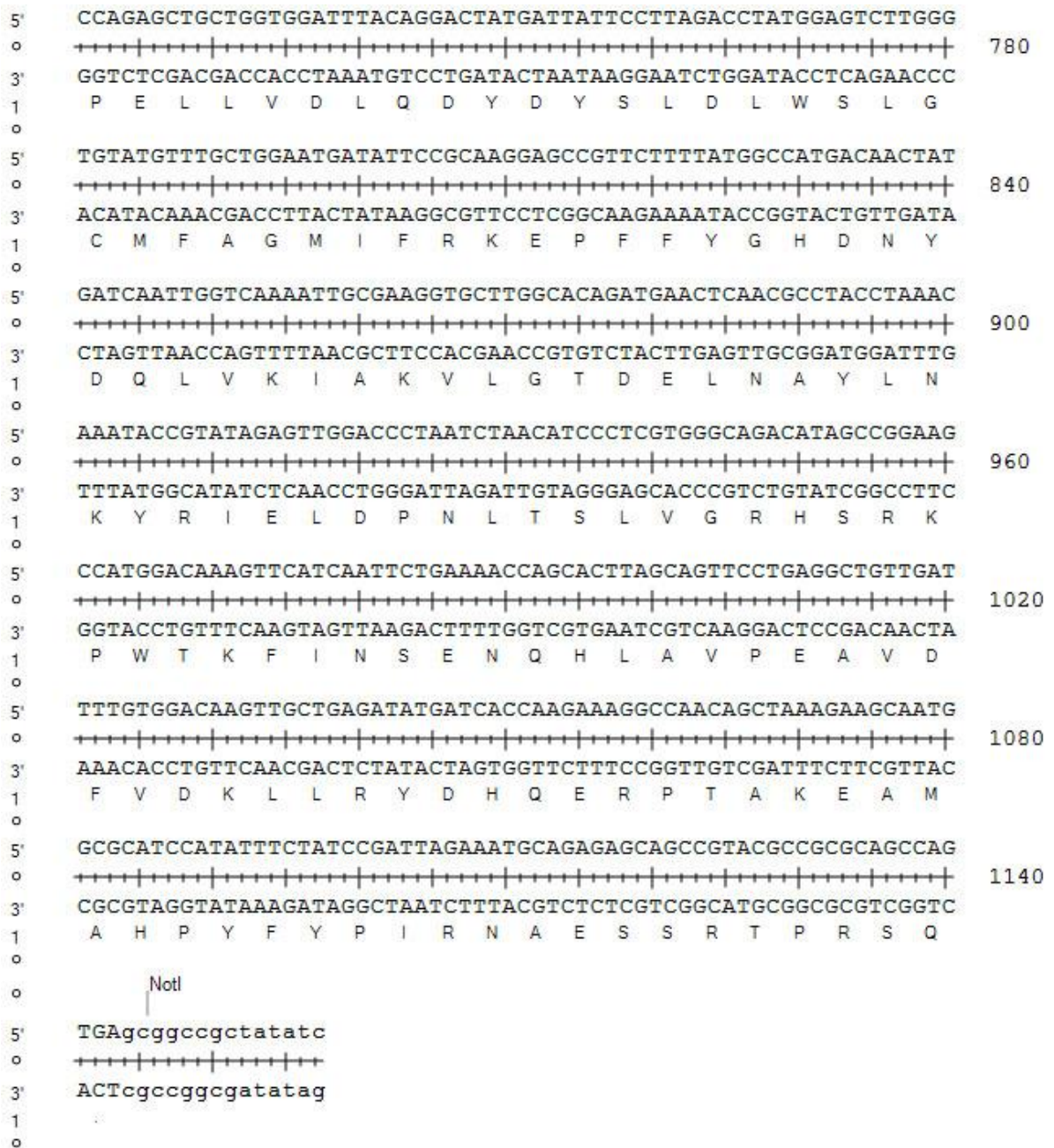


Abbildung 56: Nukleotidsequenz (5'-->3') der CDS (TAIR-Datenbank) und abgeleitete Aminosäuresequenz der AtCK2 (At2g23070) mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen. Der 4-Buchstabencode stellt die Nukleotidsequenz dar, die darunter liegenden Buchstaben die Aminosäuresequenz.

Anhang

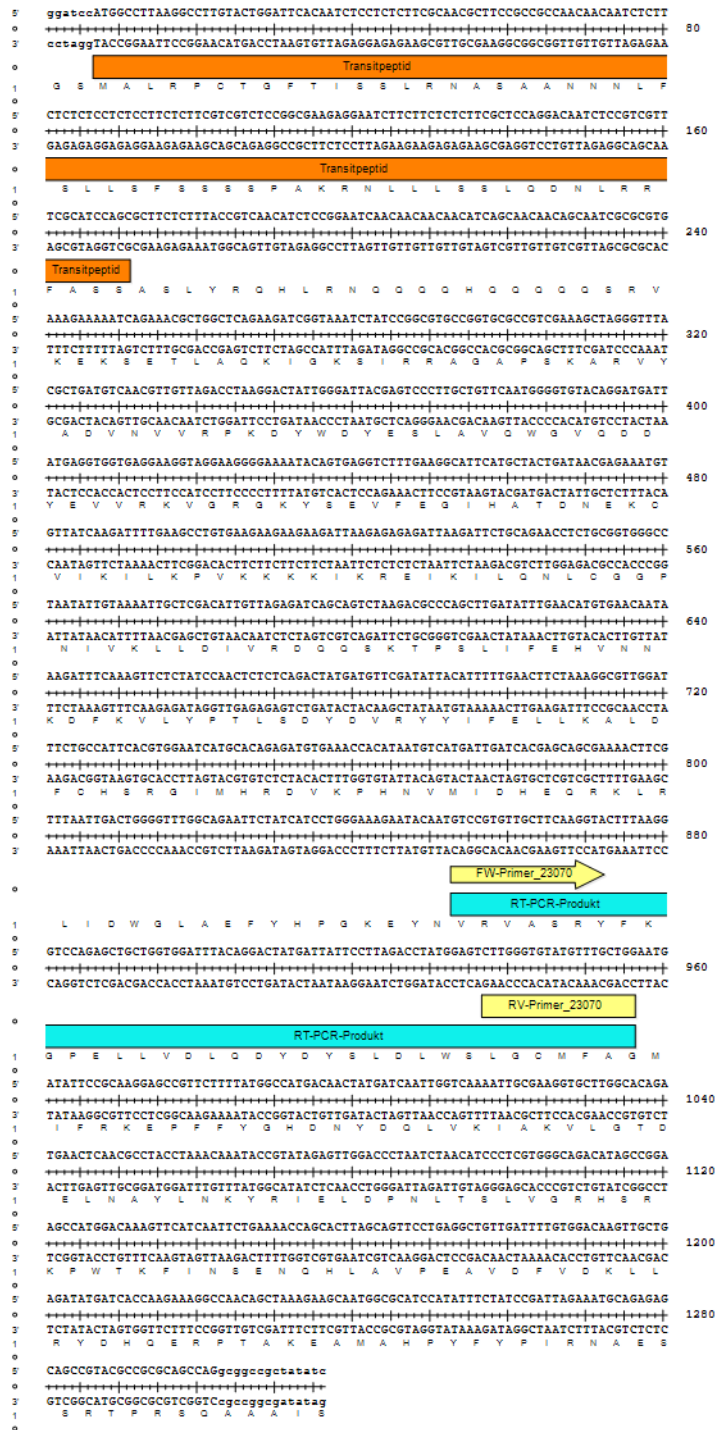


Abbildung 57: AT2G23070 104 bp PCR-Produkt



Anhang

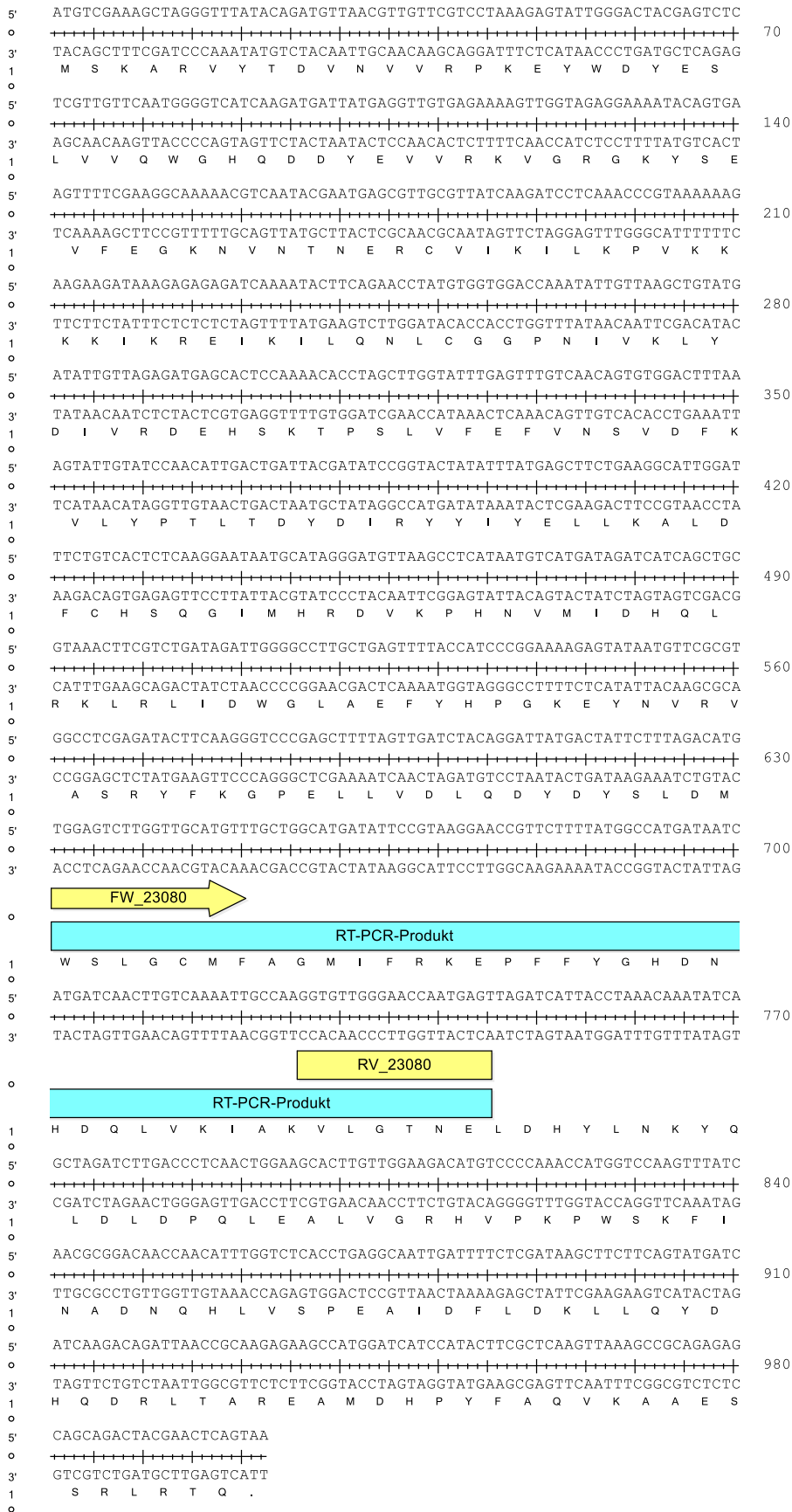


Abbildung 58: AT2G23080 115 bp Produkt



## Melt Curve Report Graph Only

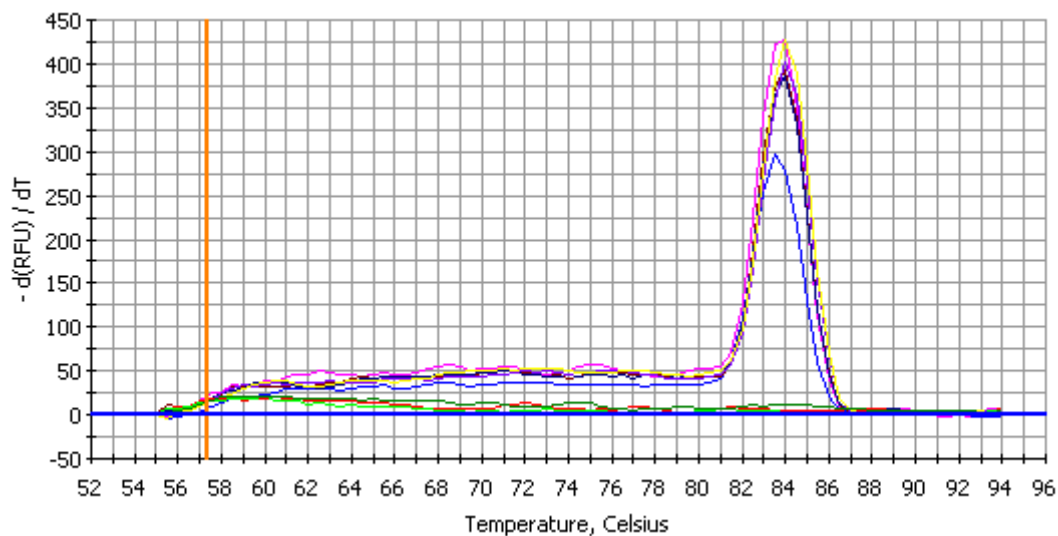
Current Date: 12-Nov-14 10:32 AM  
Data generated on: 11-Nov-14 at 12:43 PM.

Optical data file name: Data 11-Nov-14 1242.opd  
Plate Setup file used: Template\_lena\_141111.pts  
Protocol file used: 3Stepetest\_lena\_141111.tmo

Sample volume: 20.00 ul  
Hot Start? No  
Well factor collection: Experimental Plate

### Comments

#### Melt Curve Graph for SYBR-490



### Melt Curve Analysis Parameters

**Weighted Mean** digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.  
Threshold for automatic peak detection is set at **1.00**.



## Melt Curve Report Graph Only

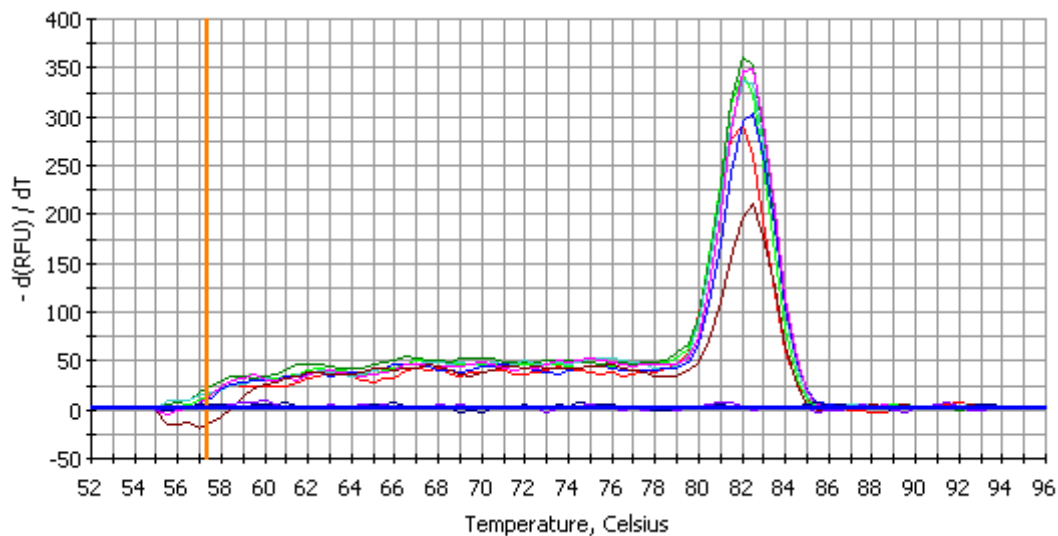
Current Date: **12-Nov-14 10:33 AM**  
Data generated on: **11-Nov-14 at 12:43 PM.**

Optical data file name: **Data 11-Nov-14 1242.opd**  
Plate Setup file used: **Template\_lena\_141111.pts**  
Protocol file used: **3Stepstest\_lena\_141111.tmo**

Sample volume: **20.00 ul**  
Hot Start? **No**  
Well factor collection: **Experimental Plate**

### Comments

#### Melt Curve Graph for SYBR-490



### Melt Curve Analysis Parameters

**Weighted Mean** digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.  
Threshold for automatic peak detection is set at **1.00**.

**Gene At2g23070**



## Melt Curve Report Graph Only

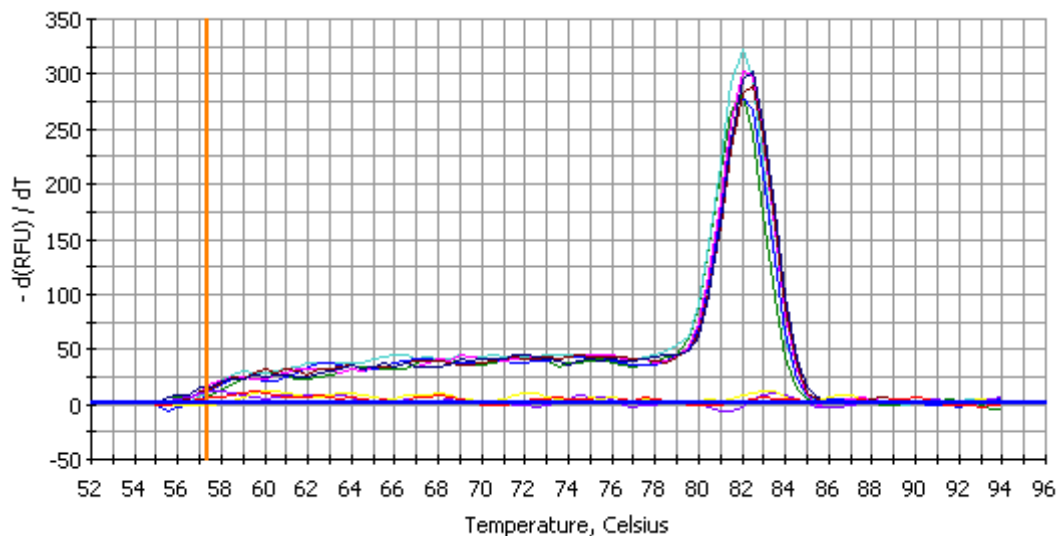
Current Date: **12-Nov-14 10:33 AM**  
 Data generated on: **11-Nov-14 at 12:43 PM.**

Optical data file name: **Data 11-Nov-14 1242.opd**  
 Plate Setup file used: **Template\_lena\_141111.pts**  
 Protocol file used: **3Stepstest\_lena\_141111.tmo**

Sample volume: **20.00 ul**  
 Hot Start? **No**  
 Well factor collection: **Experimental Plate**

### Comments

#### Melt Curve Graph for SYBR-490



### Melt Curve Analysis Parameters

**Weighted Mean** digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.  
 Threshold for automatic peak detection is set at **1.00**.

### **Gene At2g23080**

Abbildung 59: Originalschmelzkurven der quantitative RT-PCR für die Gene für Ubiquitin, AT2G23070 und AT2G23080.

Tabelle 35: Zum Peptidchip Design verwendeten Phosphopeptide als Liste der Publikationen in denen diese zuerst als Phosphorylierungsziele der CK2 erwähnt sind.

<b>Für die Phosphopeptidliste verwendeten Publikationen</b>	<b>PMID</b>	<b>PhosPhat 3.0 Eintrag (Januar 2012)</b>
Engelsberger WE, <i>et al.</i> , (2012) The Plant Journal	22060019	yes
Reiland S, <i>et al.</i> , (2011) PNAS	21768351	yes
Kline KG, <i>et al.</i> , (2010) PNAS	20733066	yes
Nakagami H, <i>et al.</i> , (2010) Plant Physiology	20466843	yes
Chen Y, <i>et al.</i> , (2010) The Plant Journal	20374526	yes
Umezawa, <i>et al.</i> , (2009) PNAS	19805022	yes
Lohrig K, <i>et al.</i> , (2009) Planta	19238429	no
Reiland S, <i>et al.</i> , (2009) Plant Physiology	19376835	yes
Ito J, <i>et al.</i> , (2009) Proteomics	19688752	yes
Wang Z, <i>et al.</i> , (2009) Journal of Proteomics	19341826	yes
Li H, <i>et al.</i> , (2009) Proteomics	19253305	yes
Jones A, <i>et al.</i> , (2009) Journal of Proteomics	19245862	yes
Whiteman S, <i>et al.</i> , (2008) Proteomics	18686298	yes
Sugiyama N, <i>et al.</i> , (2008) Molecular Systems Biology	18463617	yes
de la Fuente van Bentem S, <i>et al.</i> , (2008) Journal of Proteome Research	18433157	yes

Anhang

Carroll A, <i>et al.</i> , (2008) Molecular and Cellular Proteomics	17934214	yes
Nühse T, <i>et al.</i> , (2007) The Plant Journal	17651370	yes
Niittylä T, <i>et al.</i> , (2007) Molecular and Cellular Proteomics	17586839	yes
Benschop J, <i>et al.</i> , (2007) Molecular and Cellular Proteomics	17317660	yes
de la Fuente van Bentem S, <i>et al.</i> , (2006) Nucleic Acids Research	16807317	yes
Wolschin F, <i>et al.</i> , (2005) Plant Methods	16270910	yes
Nühse T, <i>et al.</i> , (2004) The Plant Cell	15308754	yes

---

Anhang

Tabelle 36: Liste auf dem micorarray ChloroPhos 1.0 mobilisierter Peptide.

**Supplemental Table S2: List of peptides included on the microarray ChloroPhos1.0**

type	Peptide	AGI 1	AGI 2	AGI 3	AGI 4	AGI 5	AGI 6	AGI 7	AGI 8
blank-control	AA	AT3G52930 .1							
peptide library member	AADESTGTIGKRLAS	AT1G29910 .1	AT1G29920. 1	AT1G29930 .1					
peptide library member	AAEADLDTEEDLEQT	AT3G25690 .1	AT3G25690. 2	AT3G25690 .3					
peptide library member	AAEESDGSVKEDDDD	AT3G59980 .1							
peptide library member	AAIEKLPTY SRLRTT	AT1G16080 .1							
peptide library member	AAIIRIDSPGGDALA	AT4G25650 .1	AT4G25650. 2						
peptide library member	AAKVEQITAALQTGT	AT5G19390 .1	AT5G19390. 2	AT5G19390 .3	AT5G19390. 4				
peptide library member	AAKVKKITAE LQAAS	AT2G47390 .1							
peptide library member	AALNIVPTSTGA AKA	AT2G32040 .1							
peptide library member	AALQTGTSSDKK AFD	AT1G74730 .1							
peptide library	AALSSSVTTRS YHSG	AT2G01140							

## Anhang

member		.1				
peptide library member	AAPDGATATKPKPPP	AT5G08050				
peptide library member	AASEVFGTGRITMRK	AT5G14740	AT5G14740.2	AT5G14740.3	AT5G14740.4	AT5G14740.5
peptide library member	AASEVLGSGRVTMRK	AT3G03630				
peptide library member	AASFHVMSKSVDNVL	AT5G26742	AT5G26742.2			
peptide library member	AATIAVFTGGLKVKA	AT5G63570.1				
peptide library member	AAYGKWASEIAARLQ	AT5G64040.1	AT5G64040.2			
peptide library member	ACFIPTKSDANVVT	AT5G20250.1	AT5G20250.2	AT5G20250.3	AT5G20250.4	
peptide library member	ADDSDIESPRTNGP	AT5G01530.1				
peptide library member	ADTSPDQSKEGSDSA	AT1G29930.1				
peptide library member	AEGDTSNTDVEGDRD	AT1G29910.1	AT1G29920.1			
peptide library member	A EGLGLTLSSLEK LK	AT4G29060.1	AT4G29060.2			



Anhang

peptide library member	AEHKNKASPETVADF	AT3G52140.1	AT3G5214 0.2	AT3G5214 0.3	AT3G52140. 4
peptide library member	AEKSGFSLSTIERLG	AT3G57610.1			
peptide library member	AELQAASSSDSKSFD	AT4G14870.1			
peptide library member	AENSGAITPRKTVLV	AT1G03130.1			
peptide library member	AFKSLGLSDHDEYDL	AT4G30910.1			
peptide library member	AFLVKAGSGVATLGL	AT4G22890.1	AT4G2289 0.2	AT4G2289 0.3	
peptide library member	AFTVQFGSCKFPENF	AT1G19870.1			
peptide library member	AGDEKKESPIFRLTG	AT1G29910.1	AT1G2992 0.1	AT1G2993 0.1	AT2G34420. 1
peptide library member	AGDVIGTRTEAADAK	AT4G10340.1			
peptide library member	AGKAVKLSPAASEVL	AT1G19870.1			
peptide library member	AGKAVNLSPAASEVL	AT4G17090.1			
peptide library member	AGKQILSSTQRLVLP	AT5G14260.1	AT5G1426 0.2	AT5G14260. 3	

Anhang

peptide library member	AGLGAGLTSLDKKKQ	AT2G21280.1		
peptide library member	AGQEFGTTTGRPRRC	AT5G05730.1		
peptide library member	AIEQRRDTAGSESES	AT3G52930.1		
peptide library member	AIRAEKTESSSAAPA	AT5G64040.1	AT5G6404 0.2	
peptide library member	AITPLYCSSKATAHT	AT4G02510.1		
peptide library member	AKATTEQSGPVGGDN	AT5G61210.1		
peptide library member	AKIEEDVTSEVEMAS	AT1G48620.1		
peptide library member	AKPKGPSGSPWYGSD	AT5G20720.1	AT5G2072 0.2	AT5G20720. 3
peptide library member	AKSKAVSETSDELAK	AT1G68830.1		
peptide library member	AKVQEHNsprSSPDL	AT1G15820.1		
peptide library member	ALERYDSSAFGQVVA	AT4G04640.1		
peptide library member	ALLADPSLSPRKRVA	AT5G40200.1		

Anhang

peptide library member	ALLGEGATVVLEGQK	AT1G12900.1	AT1G1290 0.3	AT1G12900. 4
protein- control	alphacasein	AT1G73990.1		
peptide library member	ALRVVNPSPYMGYLQ	AT2G37660. 1		
peptide library member	ANAAYIGTPGKGILA	AT1G19870. 1		
peptide library member	ANFARAFTVQFGSCK	AT3G20550. 1		
peptide library member	ANISNNMSDRIDGQI	AT5G23060. 1		
peptide library member	ANLPKHNSVDLKSSK	AT4G19490. 1	AT4G19490. 2	
peptide library member	APPPPPPTNVEGGE	AT4G28750. 1		
peptide library member	AQIIYSKYAGTEVEF	AT3G18890. 1		
peptide library member	AQRNALASALRLQRK	AT5G04360. 1		
peptide library member	AQRVGRKTLIVAAAA	AT3G60750. 1	AT3G60750. 2	
peptide library member	ASDLKKSLSMVYNRK	ATCG00710. 1		

## Anhang

peptide library member	ASEANPSPSRRSRGR	AT2G47400. 1	
peptide library member	ASHLLKYDSTLGIFD	AT3G47070. 1	
peptide library member	ASKPEGTGTPTKDFK	AT2G46820. 1	AT2G46820. 2
peptide library member	ASQAQQGTKDRKWQR	AT1G06690. 1	
peptide library member	ASRHDEGSNARGGSE	AT3G14440. 1	
peptide library member	ASRSFGTRSGTKFLP	AT3G17040. 1	
peptide library member	ASSQSLSSILNNPHG	AT1G59870. 1	
peptide library member	ASSSSKDSPA AAAAP	AT5G14740. 4	
peptide library member	ASSTRKSDSLSPGPT	ATCG00490.1	
peptide library member	ATIVNAKSAIGSLRK	AT1G78510.1	
peptide library member	ATLESDWSAKFAAYE	AT5G64040.1	AT5G6404 0.2
peptide library member	ATQTVEDSSRSGPRS	AT2G35410.1	

## Anhang

peptide library member	ATSEGEISEKVEKSI	AT1G55490.1	AT1G5549 0.2	
peptide library member	ATSTKGGSGGPKEEK	AT3G13470.1		
peptide library member	ATTTEAETTELPEIV	AT5G56500.1	AT5G5650 0.2	
peptide library member	AVGVSNYSEKRLRDA	AT5G66190.1	AT5G6619 0.2	
peptide library member	AVKFEHGSASYACRF	AT1G15500.1		
peptide library member	AVVDRSSSGVFSPQK	AT5G63420.1		
peptide library member	AVVEDDVYGNQLMSK	AT4G24770.1		
protein- control	betacasein	AT3G01500.1	AT3G0150 0.2	AT3G0150. 3
peptide library member	CERAVNVSLANLLTY	AT2G38040.1	AT2G3804 0.2	
peptide library member	CEVWKEITFNFTID	AT2G38040.1	AT2G3804 0.2	
peptide library member	CGRRQFPSLAKTVCK	AT1G73110.1		
peptide library member	CKFPENFTGCQDLAK	AT4G26670.1		

Anhang

peptide library member	CSVAEKETSADEETS	AT4G12610.1	AT4G1261 0.2		
peptide library member	CTLLRLASKVDAIKA	AT2G38140.1			
peptide library member	CTLLRLASKVDAIKD	AT5G63420.1			
peptide library member	CTLLRLASKVDAIKE	AT5G61210.1			
peptide library member	CVKRLVYTNDGGEIV	AT3G47070.1			
peptide library member	DAPSGETTSQLSEKS	AT5G26742.1	AT5G2674 2.2		
peptide library member	DASDSETKSSPKRVR	AT1G52510.1	AT1G5251 0.2		
peptide library member	DASEGDVSEGDESEG	AT5G19390.1	AT5G1939 0.2	AT5G1939 0.3	AT5G1939. 4
peptide library member	DDDDDEDSSSESGKSE	AT5G49910.1			
peptide library member	DDEDSSSESGKSEMVN	AT1G12800.1			
peptide library member	DEAGGMETLGKVLLR	AT1G48860.1	AT1G4886 0.2	AT2G4530 0.1	
peptide library	DEATDNDSSKALVTI	AT5G45930.1			

Anhang

member

peptide  
library

DEEEGNVSDRGDEDE AT4G02510.1

member

peptide  
library

DEKIKIDIDESLFSN AT3G04790.1

member

peptide  
library

DELADASDSETKSSP AT5G42080.1 AT5G4208 0.2 AT5G4208 0.3

member

peptide  
library

DESDNKHTLNPSKRT AT3G63190.1

member

peptide  
library

DFVLGFMTKQDQFYE AT4G02510.1

member

peptide  
library

DGEELAIKLSLPQR AT1G17745.1 AT1G1774 5.2

member

peptide  
library

DKGKEYGSTIKSGKL AT4G26670.1

member

peptide  
library

DNEVEPVTDNDNDRA AT3G18890.1

member

peptide  
library

DNGGDVIDADFTDSN AT5G19390.1 AT5G1939 0.2 AT5G19390. 3

member

peptide  
library

DNKKKSTSSLDGLKL AT4G22890.1 AT4G2289 0.2 AT4G22890. 3

member

peptide  
library

DPGCTRKTFPDYFQV AT1G19870.1

member

Anhang

peptide library member	DPLESMDSGILVTEK	AT2G05120.1	AT2G0512 0.2	
peptide library member	DQIGDDDSGEFEPVS	AT4G02510.1		
peptide library member	DQIGKLLSSGELYDI	AT3G26840.1		
peptide library member	DRTFGVLTKIDLMDK	AT5G23890.1		
peptide library member	DSCLRIISSAISPST	AT5G24490.1		
peptide library member	DSDEDVDTEDEGEEK	AT1G12900.1	AT1G1290 0.3	AT1G1290. 4
peptide library member	DSDEYNPTLPKPRIL	AT4G24770.1		
peptide library member	DSDSNLNTDGDEATD	AT4G32260.1		
peptide library member	DSDTDKSSTVAKTVT	AT5G40200.1		
peptide library member	DSKISEESGKISVDK	AT3G19170.1	AT3G19170. 2	
peptide library member	DSNVLPYCSINKAEK	AT1G33810.1		
peptide library member	DSPDTTNTIKDHSLE	AT4G12610.1	AT4G12610. 2	
peptide library	DSPVTPATQNRNFI	AT1G59870.1		



## Anhang

member

peptide  
library

DSSSEAVSGNSDKVG AT4G14870.1

member

peptide  
library

DTKMFDKYKIMGGVP AT4G28750.1

member

peptide  
library

DTTKELESSKSPVPE AT2G20260.1

member

peptide  
library

DVEDSTDSSVGEEEEE AT2G48120.1 AT2G48120.

member

2

peptide  
library

DVKPSGDSALSVDGK AT1G07320.1

member

peptide  
library

DVSEGDESEGDVSEG AT1G19870.1

member

peptide  
library

EALASLESQKEETIK AT5G65220.1

member

peptide  
library

EASANEASLPQSPEP AT1G50900.1

member

peptide  
library

EASPSPNSSKIKFQK AT4G36970.1

member

peptide  
library

EDDSKFSNAKLKVT AT3G20550.1

member

peptide  
library

EDEEEEASRKSRLGL AT4G28730.1

member

peptide  
library

EDIFSSGSRRTQSVN AT1G09795.1

member

## Anhang

peptide library member	EDKEVEISAIGAEIK	AT4G01150.1	AT4G01150. 2
peptide library member	EDPAPASSSSKDSPA	AT4G02510.1	
peptide library member	EDTPPATASSDSSST	AT3G12780.1	
peptide library member	EEDATTGSKGEGLDP	AT1G08550.1	AT1G0855 0.2
peptide library member	EEDDDEDETEGSEEA	AT5G65620.1	
peptide library member	EEDDLIGTELQGPSA	AT1G19870.1	
peptide library member	EEEEAAEEAAEAAKSA	AT1G67090.1	
peptide library member	EEIRDLILGYSTQKA	AT1G19870.1	
peptide library member	EEKAEMTTAMQSPVV	AT1G19870.1	
peptide library member	EEPSFELSGKLAET	AT1G68830.1	
peptide library member	EESIRKTVTENTVVI	ATCG00490.1	
peptide library member	EETPRWSQLLSNLGL	AT3G46780.1	

Anhang

peptide library member	EETSSIDTNELITDL	AT1G80300.1		
peptide library member	EEVEEKFTSESDSIA	AT4G02510.1		
peptide library member	EFAKKLASLADLYVN	ATCG01130.1		
peptide library member	EFPAPDPSVLVQNFN	AT5G35630.1	AT5G3563 0.2	AT5G35630. 3
peptide library member	EFRGREPSPEPLLRH	AT4G02510.1		
peptide library member	EGKTDIDSPDTNTI	AT4G01150.1	AT4G0115 0.2	
peptide library member	EHGNSPGYDGRYWT	AT2G32040.1		
peptide library member	EIDVKDATSMGTVED	AT1G19870.1		
peptide library member	EIGTGEATEQEEGKE	AT3G17040.1	AT3G1704 0.2	
peptide library member	EISDGRKTVWWNRWI	AT4G36970.1		
peptide library member	EITFNFTIDKLDGQ	AT5G17670.1		
peptide library member	EKEAEAASLAEDAQQ	AT2G43090.1		

Anhang

peptide library member	EKEMERASSVKIPVV	AT3G20550.1				
peptide library member	EKFTSESDSIADSSK	AT4G02510.1				
peptide library member	EKKLSFFSEPQQEEK	AT5G61210.1				
peptide library member	EKPVEDPSELPKWNY	AT1G19870.1				
peptide library member	ELESDKATEEGGKGL	AT3G01500.1	AT3G0150 0.2	AT3G0150 .3	AT5G14740 .1	AT5G14740. 2
peptide library member	ELLKTRASSEETSSI	AT1G15500.1				
peptide library member	ELPRRRDSEESLLLD	AT5G18820.1				
peptide library member	ELTSSTGSNKAMTLS	AT1G19870.1				
peptide library member	ELYQRALSIDANTES	AT4G23890.1				
empty	empty	AT3G63490.1	AT3G6349 0.2			
peptide library member	EMTTAMQSPVVSRRD	AT4G02510.1				
peptide library member	ENCAKAVYTPELKYV	AT4G14870.1				
peptide library	ENFGCGSSREHAPVC	AT3G03710.1				

## Anhang

member

peptide  
library  
member

EPNVEEDSVARMRAV AT4G02510.1

peptide  
library  
member

EPSGEGVTRVDGSES AT4G31390.1 AT4G31390.  
2

peptide  
library  
member

EPSLADMTNPFGGER AT5G36880.1 AT5G36880.  
2

peptide  
library  
member

EQKSGRRTSFGYDQE AT5G53170.1

peptide  
library  
member

EREAVNVSLANLLTY AT4G32520.1 AT4G32520.  
2

peptide  
library  
member

EREMERASSVKIPVV AT1G09340.1

peptide  
library  
member

ESAGDGTTTAILAR AT4G32260.1

peptide  
library  
member

ESALLKSPSPDNNNV AT1G19870.1

peptide  
library  
member

ESDDSNLSFKVPEDG AT2G35410.1

peptide  
library  
member

ESDSIADSSKLESVD AT1G19870.1

peptide  
library  
member

ESESEATPSPAEEESG AT2G01140.1

peptide  
library

ESETDKDSQKQPAG AT1G59870.1

Anhang

member

peptide  
library

ESKIENGSDVDVKQ ATCG00280.1

member

peptide  
library

ESKLDLDTIKDGAR AT3G16620.1

member

peptide  
library

ESMSQLPSGAGKISQ AT5G42270.1

member

peptide  
library

ESNRLVSDTEVSELE AT1G42970.1

member

peptide  
library

ESTGIVDYDMLEKTA ATCG00490.1

member

peptide  
library

ETESLLQSKGVNWTS AT4G25650.1 AT4G2565  
0.2

member

peptide  
library

ETIKALDSQIAALSE AT2G45290.1

member

peptide  
library

ETQNVKISPQADFVN AT1G12900.1 AT1G1290 AT1G1290  
0.3 0.4

member

peptide  
library

ETSADEETSQEEKTE AT5G11880.1

member

peptide  
library

ETTPASRTRETLESA AT1G06680.1 AT1G0668  
0.2

member

peptide  
library

ETVADFTLTMLKRRV AT1G78915.1 AT1G7891 AT1G7891  
5.2 5.3

member

peptide  
library

EVAMGRMSRDSAAEA AT5G08540.1

member

## Anhang

peptide library member	EVIFGGETMRFWDLR	AT5G05200.1			
peptide library member	EVLSSVSPTESRSDT	AT1G64510.1			
peptide library member	EVPETGVTFGDVAGA	AT5G46110.1	AT5G4611 0.2	AT5G4611 0.3	AT5G46110. 4
peptide library member	EVVVLNDSSGGVKNAS	AT4G28730.1			
peptide library member	EYKLTYYTPEYETKD	AT1G59870.1			
peptide library member	FAASKWLSHFYKTF	AT5G48300.1			
peptide library member	FAAYEKKYPEEAAEL	AT2G37660.1			
peptide library member	FDADVKPSGDSALSV	AT5G64300.1			
peptide library member	FDHCFKKSSDGFLYC	AT4G14070.1			
peptide library member	FEDNFDATSNLNMV	AT5G08280.1			
peptide library member	FEGKSGRSFDIDFDE	AT4G22890.1	AT4G2289 0.2	AT4G22890. 3	
peptide library member	FEKTAESSSDKEEDS	AT3G10840.1			
peptide library member	FERMGATYIKLGQFI	AT4G13670.1			

Anhang

peptide library member	FFEGGFGSDDDPTSP	AT3G46780.1		
peptide library member	FGNKISTQTGIGTGI	AT1G32060.1		
peptide library member	FGSRMEESIRKTVTE	AT1G54520.1		
peptide library member	FHVGTKMSNELAVPF	AT5G13550.1		
peptide library member	FIQAHRETDADITVA	AT2G31170.1		
peptide library member	FKALDLASKPEGTGT	AT3G25690.1	AT3G2569 0.2	AT3G25690. 3
peptide library member	FKGDVVEKIESESES	AT5G53170.1		
peptide library member	FLESSSFSGDAALRS	AT1G10760.1		
peptide library member	FLETLDGSCRTPIAG	AT5G26570.1	AT5G2657 0.2	
peptide library member	FLLPAKATTEQSGPV	AT4G05180.1		
peptide library member	FLNQPKQTLSTLSLS	AT2G28800.1	AT2G2880 0.4	
peptide library member	FMDDEVETDKDEAST	AT3G60750.1	AT3G6075 0.2	



## Anhang

peptide library member	FNKAKDISSGLSWNK	AT3G09050.1
peptide library member	FPGSNNGTGLFQTIV	ATCG00490.1
peptide library member	FSSRSRSSSSSSSSQS	AT1G06950.1
peptide library member	FTRRYGGSNNNSSSS	AT2G32040.1
peptide library member	FTTLSSLTDGGAPIS	AT1G15500.1
peptide library member	FVDDPNLSCEPALKK	AT5G54600.1
peptide library member	FVGGEETKSGGEEAE	AT2G36390.1
peptide library member	FVKSGGNSHLKLEID	AT2G37220.1
peptide library member	FVRLEASPSHVNLIL	AT4G02510.1
peptide library member	FYIQPLSPTEAAARA	AT5G40200.1
peptide library member	GALASSTTSKPLPEV	AT2G37220.1
peptide library member	GDATRNLSSQQCLNAL	ATCG00680.1
peptide library	GDGTSDSDSDPDPPK	AT4G34190.1

Anhang

member				
peptide library member	GDHIHAGTVVGKLEG	AT1G54520.1		
peptide library member	GDLEAQDSKAKYLQK	AT4G12610.1	AT4G12610.2	
peptide library member	GDRDTTSSIRTQPPP	AT5G13550.1		
peptide library member	GETTSQLSEKSTPTG	AT4G39040.1	AT4G39040.2	
peptide library member	GEVTKIFTHNSTIVI	AT3G55800.1		
peptide library member	GFNRLDDSAEFFTSD	AT3G52930.1		
peptide library member	GFSRGPRSSFGSSGS	AT4G38970.1	AT4G38970.2	
peptide library member	GGEVELESDKATEEG	AT2G39730.1	AT2G39730.2	AT2G39730.3
peptide library member	GGEVKEASANEASLP	AT3G60750.1	AT3G60750.2	
peptide library member	GGGSGAGSGNRVYVG	AT5G19220.1		
peptide library member	GGLFRAGSMDNGDGI	AT1G74040.1		

## Anhang

peptide library member	GGNRAASVSIRSEQS	AT1G74070. 1		
peptide library member	GGNSFSSRSRSSSSS	AT1G67090. 1	AT1G6709 0.2	
peptide library member	GGRGRKKSSGGDEEE	AT3G48500. 1	AT3G4850 0.2	
process- control	GGSGGGSYKDDDDK	AT2G38040. 1	AT2G3804 0.2	
peptide library member	GGSNNSSSSNALLK	AT1G11860. 1	AT1G1186 0.2	AT1G11860. 3
peptide library member	GIEDSEASEEVSEIG	AT2G26540. 1		
peptide library member	GIFTNVTSPYAKAKL	AT3G60750. 1	AT3G6075 0.2	
peptide library member	GILAADESTGTIGKR	ATCG00280.1		
peptide library member	GILAMDESNATCGKR	AT1G74730. 1		
peptide library member	GINPIMMSAGELESG	AT5G52840. 1		
peptide library member	GINSFGASAPAPLLY	AT3G25690. 1	AT3G2569 0.2	AT3G25690. 3
peptide library member	GIRSRVGSNVQLKDT	AT5G26742.1	AT5G2674 2.2	

Anhang

peptide library member	GIVLGKLSGRHALKD	AT2G28000.1					
peptide library member	GIVVRDPSKPPPCK	AT1G71500.1					
peptide library member	GKKKFETLSYLPDLT	AT2G37220.1					
peptide library member	GKKLSELSDEDFDE	AT1G65410.1					
peptide library member	GKPYEGSITKMPFVA	AT5G36700.1	AT5G3670 0.2	AT5G36700 .4	AT5G36790 .1	AT5G36790 .2	AT5G36790. 3
peptide library member	GKRSSVLYPASLKAG	AT4G19170.1					
peptide library member	GKSIGINSFGASAPA	ATCG00120.1					
peptide library member	GKYLMSPTGEVIFG	AT1G54520.1					
peptide library member	GLGLTLSSLEKLVF	AT1G48620.1					
peptide library member	GLIAESKTEIPAATP	AT1G19870.1					
peptide library member	GLNSVAASFHVMSKS	AT5G18660.1					
peptide library member	GLSDHDEYDLGDNN	ATCG01130.1					
peptide library	GNDDLIGSMIADAID	AT5G13630.1	AT5G1363				

Anhang

member			0.2	
peptide library member	GNVRCEATEVSSSSS	AT4G02510.1		
peptide library member	GPRSSFGSSGSGYGG	AT3G20550.1		
peptide library member	GPSGTGKSTILKIMA	AT1G06680.1	AT1G0668 0.2	
peptide library member	GQNGGCKTLLVLSGV	AT2G30790.1		
peptide library member	GRCSRYVYAAIGDPM	AT3G25690.1	AT3G2569 0.2	AT3G2569. 3
peptide library member	GRGKISASESRLIES	AT2G41220.1		
peptide library member	GRIGGNSFSSRSRSS	AT5G01590.1		
peptide library member	GRPRKDGTSPVKPA	AT5G23060.1		
peptide library member	GRRTSFGYDQEARES	AT1G19870.1		
peptide library member	GRYYAAESMLILDPE	AT1G14810.1		
peptide library member	GSAQRKPSFFEPISK	AT3G27925.1		

Anhang

peptide library member	GSDKGILSDVELLKE	AT3G01500.1	AT3G0150 0.2	AT3G01500. 3
peptide library member	GSESEEEETEEMIFGS	AT3G59400.1		
peptide library member	GSNARGGSEEPNVEE	AT4G34240.1		
peptide library member	GSPEEFLSQVNYLLG	AT2G37220.1		
peptide library member	GSPEQFLSQVNYLLG	AT2G17972.1		
peptide library member	GSPGRLSSSMNKQRG	AT4G25130.1		
peptide library member	GSQVLVLSDRSDNPE	AT4G14970.1		
peptide library member	GTDEPGPYKQIAEQF	AT1G12900.1	AT1G1290 0.3	AT1G12900. 4
peptide library member	GTDSYNFSFAQVLSP	AT1G32470.1		
peptide library member	GTELQGPSAADAANKI	AT5G13550.1		
peptide library member	GTIVVDNSSAFRMVD	AT5G51820 .1		
peptide library member	GTKVSNNGSDLYRILD	AT5G61210 .1		

## Anhang

peptide library member	GVGAAIEYAVLHLKV	AT4G02510 .1		
peptide library member	GVGADKRVFKTNYSF	AT1G19870 .1		
peptide library member	GVLYRSFSGDADLRY	AT4G24620 .1		
peptide library member	GYGGGGGSGAGSGNR	AT1G73060 .1		
peptide library member	HFLAPNSTIINLKQQ	AT4G26670 .1		
peptide library member	HGIVHNPSYEDVCTG	AT4G02510 .1		
protein- control	Histon 1	AT3G01500 .1	AT3G0150 0.2	AT3G0150. 3
protein- control	Histon 2	AT5G13110 .1		
protein- control	Histon 3	AT4G28750 .1		
protein- control	Histon 4	AT2G34430 .1		
process- control	H-KPKS- Cys(ATTO_550- SPQ- NH3	AT1G59870 .1		
peptide library member	HLKNIQKTVNVVSL	AT1G19870 .1		
peptide library member	HLLKYDSTLGIFDAD	ATCG0028 0.1		

Anhang

peptide library member	HLLPAFSISRCFSSV	AT4G01150 .1	AT4G0115 0.2			
peptide library member	HLSFTRRYGGSNNNS	AT3G23790 .1				
peptide library member	HNPGGPEYDWGIKFN	AT5G08050 .1				
peptide library member	HNSVDLKSSKPNPFD	AT5G61410.1	AT5G6141 0.2			
peptide library member	HSDEANISNNMSDRI	AT5G53460.1	AT5G5346 0.2	AT5G5346 0.3		
peptide library member	HSLKRKVSNPFIAA	AT5G26742.1	AT5G2674 2.2	AT5G2674 2.3		
peptide library member	IAEGNCGSPRSIKVY	AT1G69830.1				
peptide library member	IDFPPLPSSISSYKG	AT4G02510.1				
peptide library member	IDGNLSDSNLNTDG	AT1G16720.1				
peptide library member	IDGQIVTDSDEDVDT	AT1G12900.1	AT1G1290 0.2	AT1G1290 0.3	AT1G1290 .4	AT3G26650. 1
peptide library member	IDHRTEVSPVIVESK	AT2G45770.1	AT2G4577 0.2			



## Anhang

peptide library member	IDRDFEPVLSMTPLN	AT4G30950.1		
peptide library member	IDTNELITDLKEKWD	AT5G01600.1		
peptide library member	IEEAAMRSNLIQQIV	ATCG00490.1		
peptide library member	IERLGLLTKAEFGV	ATCG00490.1		
peptide library member	IEVDGGVTPANAYKV	AT5G02250.1		
peptide library member	IFEALGLSSEVIQKC	AT3G25690.1	AT3G2569 0.2	AT3G2569 0.3
peptide library member	IGGRSSSSSRAPSRE	AT1G15210.1	AT1G5987 0.1	
peptide library member	IGKSVGVSMMNKSPV	AT1G80380.1	AT1G80380 .2	AT1G80380. 4
peptide library member	IGVDDVSSLSPKPEA	AT2G32040.1		
peptide library member	IHRFHDRSQIVIPRA	AT3G01500.1	AT3G01500 .2	AT3G01500. 3
peptide library member	IIKGTMTTTHSYTGD	AT2G30790.1		
peptide library member	IMSGKLKSGSEIKDA	AT4G34240.1	AT4G34240 .2	

Anhang

peptide library member	IMTVCHVYDKEENYI	AT1G19870.1		
peptide library member	IPITSHASLARQRFA	AT3G60750.1	AT3G60750 .2	
peptide library member	IPPAYTKTFQGPPHG	AT3G27740.1		
peptide library member	IREACKWSPELAAAC	AT1G42970.1		
peptide library member	IRRYMDLTAHYQIKA	AT4G02510.1		
peptide library member	IRTQQQASSPGEGLN	AT5G20720.1	AT5G20720 .2	AT5G20720. 3
peptide library member	ISGYCEQTDIHSPQV	AT3G52930.1		
peptide library member	ISSTLQHYNRIYIR	AT3G46780.1		
peptide library member	ISVAEGDTSNTDVEG	AT5G63420.1		
peptide library member	ITAALQTGTSSDKKA	AT1G58200.1	AT1G58200 .2	
peptide library member	ITPTDKKSITDYGSP	ATCG00900.1	ATCG0124 0.1	
peptide library member	ITTKDFASKLIDALK	AT3G52230. 1		

## Anhang

peptide library member	IVESKGTETEEDDLI	ATCG00490. 1		
peptide library member	IVGGKGSIGINSFG	AT3G25690. 1	AT3G2569 0.2	AT3G2569 0.3
peptide library member	IVGIDLISDVSCSP	AT3G46780. 1		
peptide library member	IVKGTMTTTHSYTGD	AT1G59870. 1		
peptide library member	IVSSREFSFGGKEVD	AT3G10050. 1		
peptide library member	IYSKYAGTEVEFNDV	AT5G08540. 1		
peptide library member	KAAQEALYVRCKANS	AT4G14070. 1		
peptide library member	KADAVGVTVDGLFNK	AT5G23890. 1		
peptide library member	KAEGKENSRDDDELA	AT3G11050. 1		
peptide library member	KAEKDEVSDDEATIE	AT1G67700. 1	AT1G6770 0.2	AT1G6770 0.3
peptide library member	KARRVGGSTHQVPIE	AT1G15210. 1		
peptide library member	KDDDEDDQSSDGHED	AT4G02510. 1		
peptide library	KDDENVNSQPFMRWR	AT1G19870.		

Anhang

member		1				
peptide library member	KDSSVQSSPSRSFY	AT5G42270.1				
peptide library member	KDISSGLSWNKLGSQ	AT5G19390.1	AT5G19390.2	AT5G19390.3	AT5G19390.4	
peptide library member	KDPMRRLSTADGNR	AT4G04770.1				
peptide library member	KEAVVLYSVGHTAG	AT4G36970.1				
peptide library member	KEEDSNEEDSNTTS	AT1G32060.1				
peptide library member	KEKEVKPSSPFLESS	AT5G14740.1	AT5G14740.2	AT5G14740.3	AT5G14740.4	AT5G14740.5
peptide library member	KELESSKSPPESTD	AT4G02510.1				
peptide library member	KEMELVPTTPFVSLA	AT5G36880.2				
peptide library member	KESFGKLSSLNPGSD	AT1G67090.1	AT1G67090.2			
peptide library member	KETEMESVSAKKGVM	AT1G08640.1				
peptide library member	KEVDQEPSGEGVTRV	AT4G08510.1				
peptide library	KFEELTSSTGSNKAM	AT4G10340.1				

Anhang

member

peptide  
library

KFQEV PETGVTFGDV AT4G04640.1

member

peptide  
library

KGFVADDS DIESPRD AT3G12780.1

member

peptide  
library

KGISAGHSRNCYRGL ATCG00490.1

member

peptide  
library

KGLMVAGSPFSTGVL AT1G70610.1

member

peptide  
library

KHADFP GSNNGTGLF AT3G46780.1

member

peptide  
library

KICLPAKSKVLAESE AT3G25690.1 AT3G2569 0.2 AT3G2569 0.3

member

peptide  
library

KINADAETLEVANKF AT1G67090.1 AT5G3841 0.1 AT5G3841 0.2 AT5G3841 0.3 AT5G3842 0.1 AT5G38430. 1

member

peptide  
library

KISGSLGSRILPATQ AT4G01690.1

member

peptide  
library

KKFETLSYLPDLTDS AT5G08540.1

member

peptide  
library

KKGVTFGSFKVSKDI AT3G14210.1

member

peptide  
library

KKLSLAQTQSRHAFY AT2G01140.1

member

peptide  
library

KKPAPAKSKAVSETS AT1G79040.1

## Anhang

member

peptide  
library  
member

KKSLSMVYNRKRQAK AT3G01480.1 AT3G0148  
0.2

peptide  
library  
member

KKSVGDLTSADLKGK AT3G52930.1

peptide  
library  
member

KLEGDRESTLGFVDL AT5G64050.1

peptide  
library  
member

KLFRTDISSNIKYGC AT5G17230.1 AT5G1723 AT5G17230.  
0.2 3

peptide  
library  
member

KLGSQFATAIQNASE AT3G63130.1 AT3G6313  
0.2

peptide  
library  
member

KLKKWGWKSKDDSSVQ AT1G19870.1

peptide  
library  
member

KLPLFGCTDSAQVLK AT1G06950.1

peptide  
library  
member

KMLIKPNSTDPLKLG AT5G61210.1

peptide  
library  
member

KMVEFEKTAESSSDK AT2G39730.1 AT2G3973 AT2G39730.  
0.2 3

peptide  
library  
member

KNDIKLLYSLGASKF AT4G25650.1 AT4G2565  
0.2

peptide  
library  
member

KNKASPETVADFTLT AT3G63160.1

## Anhang

peptide library member	KPFGINGSMDLRDGV	AT3G47070.1	
peptide library member	KPLEDITDSLKIAGV	AT1G65260.1	
peptide library member	KPWSLSFSFGRALQQ	AT5G08050.1	
peptide library member	KQLPPVYTGKWATAS	AT3G60750.1	AT3G60750 .2
peptide library member	KQLRSSSYDLVKKP	AT5G14910.1	
peptide library member	KRGPQEESEVEVSKD	AT2G35500.1	
peptide library member	KRKVSNPSFIAAQSK	AT1G56190.1	AT1G56190 .2
peptide library member	KRLANAVSSGDLEAQ	AT5G52840.1	
peptide library member	KRTTSEPSLADMTNP	AT4G14970.1	
peptide library member	KRVQLAETYLSQAAL	AT4G02510.1	
peptide library member	KSDANVVTFRWFNK	AT1G19870.1	
peptide library member	KSDSDDATVPPPSGA	AT1G19870.1	
peptide library member	KSEGGFGGLGSLFKK	AT3G06350.1	

Anhang

peptide library member	KSFADNATALKTQLD	ATCG00860.1	ATCG0128 0.1	
peptide library member	KSGFSLSTIERLGLL	AT3G48500.1	AT3G48500 .2	
peptide library member	KSHWSRHTPEGATLE	AT2G28000.1		
peptide library member	KSPNLSSTHLLPLSK	AT4G02510.1		
peptide library member	KSVAQASLSALKQLI	AT4G05180.1		
peptide library member	KSVGDLNSVDLKGKK	AT4G30620.1		
peptide library member	KTEIPAATPSDPQLK	AT2G21330.1	AT2G21330 .2	AT2G21330. 3
peptide library member	KTVNVVVSLVNLCRS	AT4G17740.1	AT4G1774 0.2	
peptide library member	KVDVDDKSDNVIEEE	AT5G65780.2		
peptide library member	KVEPEESESDDVIIIV	AT5G18660.1		
peptide library member	KVSKKITSSPKQEIG	ATCG00040.1		
peptide library member	KVVIANRTYERALEL	AT1G19870.1		
peptide library	KWYFELGTSMKKFTI	AT1G31330.1		



## Anhang

member

peptide  
library

KYEGKKLSELSDDDED AT3G20390.1

member

peptide  
library

LADCVGLTLGPRGRN AT3G17040.2

member

peptide  
library

LAELEKASSGIEAHS AT3G52930.1

member

peptide  
library

LALKDRFYIQPLSPT ATCG00480.1

member

peptide  
library

LAMKERMSDLAQLSLG AT4G09160.1

member

peptide  
library

LASRTAAYYQQGARF AT4G26900.1

member

peptide  
library

LCELPGSGSNSPKIG AT2G43750.1 AT2G4375 0.2 AT3G5976 0.1 AT3G59760.3

member

peptide  
library

LDCSESPSEAGRKMG AT2G25140.1

member

peptide  
library

LDPETGEYSEEKTPS AT3G61440.1 AT3G6144 0.2 AT3G6144 0.3

member

peptide  
library

LDSKIPISSIIGSLA AT4G11960.1

member

peptide  
library

LDTLEKKSDAEGAEP AT1G54580.1 AT1G5463 0.1 AT1G5463 0.2

member

peptide  
library

LESSLKLYAPESAPA AT2G35410.1

## Anhang

member

peptide  
library

LFRMSSRSPPFASLS AT1G31330.1

member

peptide  
library

LFVDRSSSGVFSPQK ATCG00710.1

member

peptide  
library

LGDGAAESLHVVDYK AT2G32040.1

member

peptide  
library

LGQEINVTCEVQQLL AT5G36880.2

member

peptide  
library

LGSFKEETNKISDLS AT5G08050.1

member

peptide  
library

LHPKLPATQKPMEGK AT3G04790.1

member

peptide  
library

LIAVVFPSFGERYLS AT3G25690.1 AT3G2569 0.2 AT3G2569 0.3

member

peptide  
library

LISLDMGSLLAGAKF AT3G63410.1

member

peptide  
library

LIVTIHASFGERYLS AT3G56690.1

member

peptide  
library

LKASTDQSGQVGGEE AT5G61210.1

member

peptide  
library

LKEADEITAATKFAA AT3G23400.1

member

peptide  
library

LKFSLRSASESEDGD AT4G13430.1

member

Anhang

peptide library member	LKLYAPESAPALALN	AT4G08390.1	AT4G0839 0.2	AT4G0839 0.3	AT4G08390. 4
peptide library member	LLKPLNSEYGKVAPG	AT2G41220.1			
peptide library member	LLLDSRISVAEGDTS	AT5G04140.1	AT5G0414 0.2		
peptide library member	LLLHRKMSSNSLRHV	AT4G17740.1	AT4G1774 0.2		
peptide library member	LLSLAEKSGFSLSTI	AT1G15210.1			
peptide library member	LLSSGELYDIVGIPT	AT5G01590.1			
peptide library member	LMLEYAGSERGQGDT	AT4G01690.1	AT4G0169 0.2		
peptide library member	LMLNGAITFPKGLGS	AT1G73060.1			
peptide library member	LNLMDGISRTDGVVV	AT2G45290.1			
peptide library member	LNPSKRRTSEPSLAD	AT3G60750.1	AT3G6075 0.2		
peptide library member	LNRGLVASVDDLERA	AT4G02510.1			
peptide library member	LNIVENRTSVPFEPV	AT2G39730.1			

## Anhang

peptide library member	LPDAGPPSPATHLRE	AT5G45930.1			
peptide library member	LPGKKVSAYIARLRN	AT2G47730.1			
peptide library member	LPGKKVSAYIARLRS	AT5G48220.1			
peptide library member	LPGSGSNSPKIGYIK	AT5G23060.1			
peptide library member	LPGVTGLSTEQRKRL	AT3G55800.1			
peptide library member	LPKFSSKSPKPETAG	AT5G45930.1			
peptide library member	LPKPQQQTVGSFRKG	AT1G72640.2			
peptide library member	LPSSISSYKGSSDDF	AT5G14740.1	AT5G1474 0.3	AT5G1474 0.4	AT5G1474. 5
peptide library member	LPTYTPDSPGDATR	AT4G08390.1	AT4G0839 0.2	AT4G0839 0.3	AT4G0839. 4
peptide library member	LPTYTPESPGDATR	AT5G26742.1	AT5G2674 2.2		
peptide library member	LPVEDIVSSREFSFG	AT3G47470.1			
peptide library member	LPVPEGCTDPVAENF	ATCG01130.1			

Anhang

peptide library member	LQGRDQVTAEDVGIV	AT1G52220.1	AT1G5222 0.2	AT1G5222 0.3	
peptide library member	LQKVLDVYEARLAKS	AT5G13650.1	AT5G1365 0.2		
peptide library member	LQFPSSATQRRLLSP	AT3G09050.1			
peptide library member	LQSRLGTDSYNFSFA	AT1G31190.1			
peptide library member	LRATFDNSEYSKLID	AT2G32480.1			
peptide library member	LRKDPLESMDSGILV	AT1G76080.1			
peptide library member	LRPKDGSLSGDDDEF	AT4G38970.1	AT4G3897 0.2		
peptide library member	LRRMGNESYEDAIEA	AT1G32470.1			
peptide library member	LSASSLSFVRSLSVS	AT5G28500.1	AT5G2850 0.2		
peptide library member	LSEEFKSLGLSDHD	AT5G24400.1			
peptide library member	LSFTSIGSSAKTSSF	AT3G46780.1			
peptide library member	LSIEKKLSFFSEPQQ	AT5G38410.1	AT5G3841 0.2	AT5G3841 0.3	AT5G3842 0.1

Anhang

peptide library member	LSKIVKKSVDILGQ	AT4G15530.1	AT4G1553 0.2	AT4G1553 0.3	AT4G1553 0.4	AT4G15530 .5	AT4G15530. 6
peptide library member	LSKNTSITYKNTKVN	AT1G17745.1	AT1G17745. 2				
peptide library member	LSKSGDGTSDSDSDP	AT5G66190.1					
peptide library member	LSNSFKSTTRLQTKA	AT5G19220.1					
peptide library member	LSPNVRITKVRPRNI	AT3G53130.1					
peptide library member	LSRSMSETVVFARMN	AT3G46780.1					
peptide library member	LSSRTAAYYQQGARF	AT5G59250.1					
peptide library member	LSSSASKSHLLPAFS	AT1G68830.1					
peptide library member	LSSSIFTQSKTHGFF	AT5G23040.1					
peptide library member	LSVSSIGTGSTKKSS	AT5G53170.1					
peptide library member	LSWNKLG SQFATAIQ	AT2G05120.1	AT2G05120. 2				
peptide library member	LSYLPDLSDVELAKE	AT4G26670.1					

## Anhang

peptide library member	LTARGGMTSHAAVVA	AT5G12860.1	AT5G12860. 2
peptide library member	LTEDNRFSTVGSDSD	AT5G35170.1	AT5G35170. 2
peptide library member	LTKISSVSPQRIFLK	AT1G50250.1	
peptide library member	LTQYNSASLNRHLAR	ATCG00710.1	
peptide library member	LTTLRTLSSGKNDE	AT3G14550.1	
peptide library member	LTWVAKQTAFQLGKT	AT5G45930.1	

Anhang

peptide library member	LVDDAYLSVKTAYED	AT1G59870.1				
peptide library member	LVKTVTETIDEISDG	AT5G19390.1	AT5G1939 0.2	AT5G1939 0.3	AT5G1939 0.4	
peptide library member	LVRNSSKTSLLPFRN	AT1G08540.1				
peptide library member	LVSDTEVSELETNDR	AT1G15210.1				
peptide library member	LYKFDPYDAGKVLVD	AT3G16000.1				
peptide library member	MAANDSSNAIDIDGN	AT5G61210.1				
peptide library member	MASLALSGSCSLAFP	AT5G14740.2				
peptide library member	MASLSLSSAHFSSTS	AT1G59870.1				
peptide library member	MASNLLRSSSNFFL	AT5G11670.1				
peptide library member	MATQTVEDSSRSGPR	AT1G66670.1				
peptide library member	MATTVHLSSFSLEFIQ	ATCG00350.1				
protein- control peptide library	MBP bovine	AT5G14740.1	AT5G1474 0.2	AT5G1474 0.3	AT5G1474 0.4	AT5G1474. 5
	MDSGILVTEKFYEVF	AT1G79850.1				



## Anhang

member

peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member

MDYNPNLPLGGGGV AT5G36880.2

peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member

MEDGRMKTLEIGEM AT5G28500.1 AT5G2850  
0.2

MEDIFNTSSRRTKSV AT1G08640.1

MEREARKSLETDLEE AT1G50200.2

peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member  
peptide  
library  
member

MFGLRKSPANLPKHN AT3G63490.2

MGNESYEDAIEALKK AT5G65780.2

MGRMSRDSAAEASGG AT2G34430.1

MGSTPTDLPGEDVAD AT4G02780.1

MIHQPLGTAGGKATE ATCG00480.1

MIIRSPEPEVKILVD AT2G40490.1

MITSSLTSSLQALKL AT5G13550.1

Anhang

peptide library member	MKIGSPSSPILSVVS	ATCG00020.1		
peptide library member	MLILDPETGEYSEEK	ATCG00270.1		
peptide library member	MLSLTATTLSSSIFT	AT5G05000.1	AT5G0500 0.2	AT5G05000. 3
peptide library member	MNRKKGVTFGSFKVS	AT5G20250.1	AT5G2025 0.2	AT5G20250. 3
peptide library member	MPGSEPSETQWPAKR	ATCG00560.1		
peptide library member	MPNPKAGTVTANIPQ	AT4G36970.1		
peptide library member	MQKRELEYCIENKRE	AT3G63160.1		
peptide library member	MRKASKPTGPSGSPW	AT3G47070.1		
peptide library member	MRLDRPGSVQASRLA	AT5G04360.1		
peptide library member	MRTNPTTSNPEVSIR	ATCG00130.1		
peptide library member	MSILQVSTSSLSST	AT2G35410.1		
peptide library member	MSYASLSVKDLTSLV	AT4G13430.1		

## Anhang

peptide library member	MTAILERRESESLWG	AT5G40200.1	
peptide library member	MTIALGKFTKDEKDL	AT5G20250.4	
peptide library member	MTIDVLLYVDRLDVY	AT2G39730.1	
peptide library member	MTIKPAVRISDGNLI	AT5G51820.1	
peptide library member	MTQSNPNEQSVELNR	AT1G80300.1	
peptide library member	MVAGSPFSTGVLEAD	AT1G32060.1	
peptide library member	MVEKSGGEVNFPKLE	AT2G28800.1	AT2G28800. 4
peptide library member	MVSSLLMSFAPATVR	AT5G61210.1	
peptide library member	NAKSAIGSLRKETDG	AT4G17740.2	
peptide library member	NANIGMFGTMKEITD	AT4G02510.1	
peptide library member	NASEDGDTVEDKNTS	ATCG01130.1	
peptide library member	NASFVADYRFDVSKL	AT1G06680.1	AT1G06680. 2
peptide library	NEASLPQSPEPVSAS	AT1G31330.1	

Anhang

member

peptide  
library  
member

NEEEEDMTIKPAVRI AT3G47470.1

peptide  
library  
member

NFDPTARSDDGTCVY AT2G03390.1 AT2G03390.  
2

peptide  
library  
member

NGGFIMSASHNPGGP AT1G69830.1

peptide  
library  
member

NGSLGESPSSSPEKS AT1G73110.1

peptide  
library  
member

NGTGLFQTIVGLKIR AT2G05120.1 AT2G0512  
0.2

peptide  
library  
member

NKAVAKDTVELVEES AT5G08540.1

peptide  
library  
member

NKHTLNPSKRRTTSEP AT4G26670.1

peptide  
library  
member

NKINPNFSIQISKAS AT4G04770.1

peptide  
library  
member

NKMSGQITVRTSSSD AT2G47390.1

peptide  
library  
member

NKSLEWTNSSLSEKK AT5G19390.1 AT5G1939  
0.2 AT5G19390.  
3

peptide  
library  
member

NLNVMVPTDKKSIT AT5G10000.1

peptide  
library  
member

NPRSNKSLTQSVPKS AT5G14200.1 AT5G1420  
0.2 AT5G14200.  
3

Anhang

peptide library member	NRDLSFTSIGSSAKT	AT2G20260.1																	
peptide library member	NRPRHEVPFDSQDED	AT1G03130.1																	
peptide library member	NRSFIPISLNLRSHF	AT5G42080.1	AT5G4208 0.3																
peptide library member	NRVPLIVTGNDFSTL	AT4G28750.1																	
peptide library member	NRVPPDSPVTPATQ	AT1G19870.1																	
peptide library member	NSSVEEETEEVEED	AT4G04020.1																	
peptide library member	NTDGDEATDNDSSKA	AT5G51070.1																	
peptide library member	NTKSRIISKGISAGH	AT3G60750.1	AT3G6075 0.2																
peptide library member	NTSDADTSPDQSKEG	AT2G37660.1																	
peptide library member	NTTDSKISEESGKIS	ATCG0068 0.1																	
peptide library member	NTTYFGLSSSRGNFG	AGI 1	AGI 2	AGI 3	AGI 4	AGI 5	AGI 6	AGI 7	AGI 8										
peptide library member	NVLQKAGSLEGLEFD	AT3G60750 .1	AT3G60750. 2																
peptide library	PAAIGGGSSKSTTIV	AT5G61210																	

Anhang

member		.1							
peptide library member	PAITTTTSAVKKLHL	AT1G42970							
peptide library member	PALRVEVTNAAIESL	AT3G25660							
peptide library member	PAPASSSSKDSPAAA	AT3G18890							
peptide library member	PASRTRETLESALLK	AT5G36880							
peptide library member	PDFKIRATDIDDEWG	AT3G54090							
peptide library member	PDSSTIRVTDKTSIA	AT1G23740							
peptide library member	PEGATLESDWSAKFA	AT1G14810							
peptide library member	PEGTGTPTKDFKALF	AT3G01500	AT3G01500.	AT3G01500	AT5G14740	AT5G14740	AT5G14740	AT5G14740	AT5G14740.
		.1	2	.3	.1	.2	.3	.4	5
peptide library member	PEKLAFYDYIGNNPA	AT3G63160							
		.1							
peptide library member	peptide	AT1G59870							
		.1							
peptide library member	PESPGDATRNLSQQC	AT4G12800							
		.1							
peptide library member	PFDSDESNDNKHTLN	AT5G42270							
		.1							

Anhang

peptide library member	PGAEAVGSGDPLEDF	AT1G59870 .1			
peptide library member	PGGSSGGSAAVAAR	AT1G42960 .1			
peptide library member	PGPTDSDTKSSTVA	AT3G25690.1	AT3G2569 0.2	AT3G2569 0.3	
peptide library member	PILSVVSSSGSLDPK	AT2G20260.1			
peptide library member	PKASINGSGITNGAA	AT3G09050.1			
peptide library member	PKGPFPSRVADAFS	AT2G05120.1	AT2G0512 0.2		
peptide library member	PLAAEKGTIVVDNSS	AT3G53460.1	AT3G5346 0.2	AT3G5346 0.3	AT3G5346. 4
peptide library member	PLDGNNSTDFIEDWV	AT1G48620.1			
peptide library member	PLFKKLSSSKDKSDS	AT5G17170.1			
peptide library member	PLGGGGVSMRRSISR	AT3G47860.1			
peptide library member	PMASQLRSSFSSASL	AT1G19870.1			
peptide library member	PMDFGRSKSKFQEVF	AT1G12900.1	AT1G1290 0.3	AT1G1290 0.4	
peptide library	PMRRSLSTADGNRRG	AT2G34430.1			

Anhang

member

peptide  
library  
member

PNGAALSTDEIEATA AT4G14870.1

peptide  
library  
member

PNLPRIRTQQQASSP AT4G19490.1 AT4G1949  
0.2

peptide  
library  
member

PPATASSDSSSTTAA AT3G01480.1 AT3G0148  
0.2

peptide  
library  
member

PPKPEGDTRRQELLA AT1G59870.1

peptide  
library  
member

PPPDSPVTPATQNRN AT3G26840.1

peptide  
library  
member

PPPKREESFSRGPRS AT1G80300.  
1

peptide  
library  
member

PPPTNVESGGEEVAV AT5G14740.1 AT5G14740 AT5G1474 AT5G14740 AT5G14740.  
1 .2 0.3 .4 5

peptide  
library  
member

PRFGRKLTETQKARA AT3G22960.  
1

peptide  
library  
member

PSDGDSESM MMMMM  
R AT1G67090.  
1

peptide  
library  
member

PSFIAAQSKFEELTS AT1G80300.  
1

peptide  
library  
member

PSGDSALSVDGKIIK ATCG00860.1 ATCG0128  
0.1



Anhang

peptide library member	PSGSPWYGSDRVKYL	AT1G19870. 1		
peptide library member	PSPAEEESGSGEDKEV	ATCG00650. 1		
peptide library member	PSPLTKSISDASSQS	AT3G09050. 1		
peptide library member	PSTEKTRTVPLEIMV	AT4G09160. 1		
peptide library member	PTYSRLRRTLMNAVV	AT4G09160. 1		
peptide library member	PVSHFNIYKLLREKA	ATCG00650. 1		
peptide library member	PVVSQDESGNGSLGE	AT2G39730. 1	AT2G39730 .2	AT2G3973 0.3
peptide library member	QAASSSDSKSFDPVE	AT5G55220. 1		
peptide library member	QAIGSSFSDKISEEI	AT3G08940. 1	AT3G08940 .2	
peptide library member	QCISFIAYKPPSFTG	AT4G30690. 1	AT4G30690 .2	
peptide library member	QDESGNGSLGESPSS	AT1G31330. 1		
peptide library member	QDVSFVPSRRSENKE	AT5G64940.1	AT5G64940 .2	

Anhang

peptide library member	QEHNSPRSSPDLQER	AT1G68830.1			
peptide library member	QFERSESTPRTTSLR	AT4G15530.1	AT4G15530 .4	AT4G1553 0.5	AT4G15530. 6
peptide library member	QFLCLSKSGDGTSDS	AT2G28800.1	AT2G28800 .4		
peptide library member	QIPRSLGSFKEETNK	ATCG00560.1			
peptide library member	QKIQIPRSLGSFKEE	AT5G40200.1			
peptide library member	QKQFERSESTPRTTTS	AT1G66670.1			
peptide library member	QLAETYLSQAALGDA	ATCG00900.1	ATCG0124 0.1		
peptide library member	QLRQKYKSLGALKIV	AT5G01220.1			
peptide library member	QNLAKNLYGEVIGTR	AT1G03130.1			
peptide library member	QNMIGLVSKEEAVRR	AT3G03710.1			
peptide library member	QQIKKLESSLKLYAP	AT5G26742.2	AT5G26742 .3		
peptide library member	QQKQVEVSVTPGGRW	AT4G01150.1	AT4G01150 .2		

Anhang

peptide library member	QRKLVKTVTETIDEI	AT5G65620.1		
peptide library member	QRLSIAKTGLHRETK	AT3G25690.1	AT3G25690 .2	AT3G2569 0.3
peptide library member	QSESEEGSDDEEEEA	AT4G24280.1		
peptide library member	QSNPNEQSVELNRTS	AT1G09420.1	AT1G0942 0.2	
peptide library member	QSPEPVSASEANPSP	AT3G22960.1		
peptide library member	QSPSRLPSFEELDTT	AT2G28800.1	AT2G2880 0.4	
peptide library member	QVPIEIGSTQGKALA	AT2G38040.1	AT2G3804 0.2	
peptide library member	QVREDESEIDAPLL	AT5G26742.2	AT5G2674 2.3	
peptide library member	RAEKTESSAAPAVK	AT3G26740.1		
peptide library member	RALLPESETDKDSQK	AT2G41040.1		
peptide library member	RAPSRERSFGGSCFI	AT1G17745.1	AT1G1774 5.2	
peptide library member	RASSEETSSIDTNEL	AT1G33810.1		

## Anhang

peptide library member	RAYLSRASSGDLNT	AT2G39730.1	AT2G3973 0.2	AT2G39730. 3
peptide library member	RDLSKNLSPKSQAKA	AT4G00690.1		
peptide library member	RDNKSLGSFRLDGIP	AT3G60750.1	AT3G6075 0.2	
peptide library member	RDVILGQYKSSSRDK	AT5G23060.1		
peptide library member	REEKRHESVPLQAIG	AT4G04770.1		
peptide library member	REGALASSTTSKPLP	AT5G08650.1		
peptide library member	RELAAEESDGSVKED	ATCG01000.1	ATCG01130. 1	
peptide library member	RERSFGGSCFICGKS	AT2G34430.1		
peptide library member	REYEEYNPKTVFRE	AT1G48620.1		
peptide library member	RFPSAAISAVAPKSD	AT4G28730.1		
peptide library member	RFSTVGSDSDEYNPT	AT4G02510.1		
peptide library member	RGDDEDDSDKFSNAK	AT5G48960.1		
peptide library	RGLAYDTSDDQQDIT	AT4G30950.1		

## Anhang

member

peptide  
library

RGLSLQFSQVIRDVI AT3G47470.1

member

peptide  
library

RHTPEGATLESDWSA AT3G18680.1

member

peptide  
library

RIIPAASRSFGTRSG AT2G47400.1

member

peptide  
library

RIISKGISAGHSRNC AT2G41220.1

member

peptide  
library

RIPAPLDTAGKPLRA AT1G59870.1

member

peptide  
library

RIPSPIFTKKLKGTS AT5G63310.1

member

peptide  
library

RITMRKASKPTGPSG AT2G11810.1 AT2G11810.2

member

peptide  
library

RKDGTSPTVKPAASV ATCG00900.1 ATCG01240.  
1

member

peptide  
library

RKVTENTVVIYSKT AT2G46820.1 AT2G46820.2

member

peptide  
library

RKVVEGDSAEEDENK AT2G31170.1

member

Anhang

peptide library member	RLDDGFISADLGTLD	AT4G14870.1		
peptide library member	RLMKTIMTVCHVYDK	ATCG00280.1		
peptide library member	RLNRDLSFTSIGSSA	ATCG00750.1		
peptide library member	RLPSFDGTSKPPLKW	AT3G47860.1		
peptide library member	RMVVVKATSEGEISE	AT3G52230.1		
peptide library member	RNGKMPTVTMEQAQK	AT5G17520.1		
peptide library member	RNIEDIFSSGSRRTQ	AT4G32770.1		
peptide library member	RNIVHGSDSPENGKR	AT3G52230.1		
peptide library member	RNKVLASTLASHEWK	AT1G54520.1		
peptide library member	RNMAFKLSSELVDAA	AT5G16150.1	AT5G1615 0.2	AT5G16150. 3
peptide library member	RNVVTRATTEVGEAP	AT3G04790.1		
peptide library member	RRCFTTLSSLTDGGA	AT1G02280.1	AT1G0228 0.2	

Anhang

peptide library member	RRDTAGSESESEATP	AT4G31850.1		
peptide library member	RRFYHVETLFNGTLA	AT1G19870.1		
peptide library member	RRSGILLSFVRDVTP	AT1G48620.1		
peptide library member	RRSHSSVTVKCCCSS	AT2G39730.1	AT2G3973 0.2	AT2G39730. 3
peptide library member	RSDKKEATGDDDQKD	AT4G02510.1		
peptide library member	RSINSESDSDSDFPH	AT4G15560.1		
peptide library member	RSISRVASISISTPNS	AT3G60750.1	AT3G6075 0.2	
peptide library member	RSNGSDSSSPPIKLP	AT2G41040.1		
peptide library member	RSRSSSSSSSQSYSV	AT4G32520.1	AT4G3252 0.2	
peptide library member	RSVRAQASSDGDEEE	AT4G19490.1	AT4G1949 0.2	
peptide library member	RTEEQARSLGIPLVG	AT2G39730.1	AT2G3973 0.2	AT2G39730. 3
peptide library member	RTIDVLLYVDRLDVY	AT5G63420.1		

## Anhang

peptide library member	RTLFEKFTKDLGVQP	AT3G01500.1	AT3G0150 0.2	AT3G01500. 3
peptide library member	RTRETLESALLKSPS	AT4G39040.1	AT4G3904 0.2	
peptide library member	RVDAGGASSVAPPPP	AT4G02510.1		
peptide library member	RWRGLAYDTSDDQQD	AT3G11670.1	AT3G1167 0.2	
peptide library member	SAKELDSSSEAVSGN	AT4G39040.1	AT4G3904 0.2	
peptide library member	SALSRLQSNPALREL	AT2G35410.1		
peptide library member	SAPAPLLYKEFGITV	AT4G02510.1		
peptide library member	SASTSVRSRFPAAI	ATCG00650.1		
peptide library member	SCLTNKYSEGLPGKR	AT5G23060.1		



Anhang

peptide library member	SDASSQSLSSILNNP	AT2G37220.1		
peptide library member	SDDQQDITRGKGMVD	AT5G23060.1		
peptide library member	SDSETKSSPKRVRKN	AT3G48730.1		
peptide library member	SDSRVCPSHVLDLDFQP	AT3G58610.1	AT3G5861 0.2	AT3G58610. 3
peptide library member	SEASEEVSEIGDKEE	AT3G60210.1		
peptide library member	SEAVSGNSDKVGADD	AT3G48110.1		
peptide library member	SEFRRVYSAPEISRK	AT4G02510.1		
peptide library member	SERGIEDSEASEEVS	AT4G35770.1	AT4G3577 0.2	AT4G35770. 3
peptide library member	SESEDGDSVEANNAS	AT1G80380.1	AT1G8038 0.2	AT1G80380. 4
peptide library member	SESLKVGSVDAEEDS	AT1G29900.1		
peptide library member	SESTPRTTSLRTRKK	AT5G26570.1	AT5G2657 0.2	
peptide library member	SFAQVLSPSRIIPAA	AT2G47910.1	AT2G4791 0.2	

## Anhang

peptide library member	SFGSSGSGYGGGGGS	AT5G64280.1				
peptide library member	SFGTRSGTKFLPSSD	AT4G10340.1				
peptide library member	SFLVKAGSGVATLGL	AT5G23890.1				
peptide library member	SFMVDNCSTTARLGS	AT3G16290.1				
peptide library member	SFRINAVSTKWEPAK	AT3G51140.1				
peptide library member	SGDVIPKTDAGMVLA	AT5G61210.1				
peptide library member	SGEFEPVSDKAIEEV	AT2G34430.1				
peptide library member	SGMVKNPSFLRQVSS	AT5G23890.1				
peptide library member	SGSSLISSTLQHYNN	AT1G06690.1				
peptide library member	SGTLSEITKEDLYEV	AT5G14740.1	AT5G1474 0.2	AT5G1474 .3	AT5G1474 .4	AT5G1474. 5
peptide library member	SHVNLILSTEGRSRT	AT5G19760.1				
peptide library member	SIGRLDLSPFQRAIG	AT5G36880.2				
peptide library	SISSPRFTLRATASS	ATCG01130.1				

## Anhang

member

peptide  
library

SKAVSETSDELAKWY AT1G80300.1

member

peptide  
library

SKDELNIYSQDELDD AT2G34590.1

member

peptide  
library

SKDLPVVSNRIPYTD AT5G36880.1 AT5G3688  
0.2

member

peptide  
library

SKLNNRNSAWPVLKS AT2G35410.1

member

peptide  
library

SKPNPFDSDESNDK AT3G18890.1

member

peptide  
library

SKPTGPSGSPWYGSD AT5G51020.1

member

peptide  
library

SKSPVPESTDGSKDE AT4G37040.1

member

peptide  
library

SKVKLGGSDLKVTKL AT5G13550.1

member

peptide  
library

SKVLAESESAFEDQ ATCG00120.1

member

peptide  
library

SLDCAMKTLKEGGPL AT1G19870.1

member

peptide  
library

SLDPKISGSLGSRIL AT3G20550.1

member

peptide  
library

SLEWTNSSLSEKKIK AT3G25690.1 AT3G2569 AT3G25690.

Anhang

member			0.2	3
peptide library member	SLGESPSSSPEKSAP	AT1G19870.1		
peptide library member	SLKPFDLTYTIGNSVK	AT5G62720.1	AT5G6272 0.2	
peptide library member	SLRHVESMSQLPSGA	AT3G23400.1		
peptide library member	SLRSASESEDGDSVE	AT1G19870.1		
peptide library member	SLSPGPTDSDTDKSS	AT5G36880.2		
peptide library member	SLTGEKFTREQASRD	AT5G42070.1		
peptide library member	SMQLSRTFSGLDLL	AT4G12800.1		
peptide library member	SNNNSSSSNALLKEP	AT4G12800.1		
peptide library member	SPAPGIISRRSVYEP	AT5G26742.1		
peptide library member	SPDNNNVSEKQQQSF	AT5G26742.1		
peptide library member	SPERAIASRHDEGSN	AT5G23060.1		
peptide library member	SPGEGLNSVAASFHV	AT3G22960.1		

Anhang

peptide library member	SPKQEIGTGEATEQE	AT1G79850.1		
peptide library member	SPMLANVSSRHSLGI	AT3G25690.1	AT3G2569 0.2	AT3G25690. 3
peptide library member	SPPPSIRYSFSPLTT	ATCG00710.1		
peptide library member	SPRIQRSASQAQQGT	AT4G37040.1		
peptide library member	SPSSPILSVVSSSGS	AT4G32770. 1		
peptide library member	SPSSVETDNDNDND	AT2G32180. 1		
peptide library member	SPTKRVSSFTVRAVK	AT3G63140. 1		
peptide library member	SQLRSSFSSASLSQR	AT5G08540. 1		
peptide library member	SRAPSRESFGGSCFI	AT2G20260. 1		
peptide library member	SRESFGGSCFICGKS	AT3G18680. 1		
peptide library member	SRLGTDSYNFSFAQV	AT4G12800. 1		
peptide library member	SRPERTISVSYDGFA	AT4G02510. 1		
peptide library	SRPISKTKSFVALPV	AT3G53130.		

Anhang

member			1		
peptide library member	SRSFYGGSPGRLSSS	AT1G59870.	1		
peptide library member	SRSGPRSTTVGKLLK	AT3G12930.	1		
peptide library member	SRTFSGLTDLLFNRR	AT5G66190.	1		
peptide library member	SRVSASISTPNSETD	AT5G13550.	1		
peptide library member	SRWSVWKTGKCKLPW	AT4G14070.	1		
peptide library member	SSAGIYKSTEQPPHV	AT3G25690.	1	AT3G2569 0.2	AT3G25690. 3
peptide library member	SSDKEEDSNEEDDSN	AT3G63160.	1		
peptide library member	SSDSSSTTAAAAPAK	AT3G53560.	1		
peptide library member	SSFPRLPSPFDGTSKP	AT5G26742.	2	AT5G2674 2.3	
peptide library member	SSFSSASLSQRLAVP	AT5G26742.1			
peptide library member	SSGIEAHSDEANISN	AT1G54520.1			
peptide library member	SSGKNDESGIPIANA	AT1G54520.1			

## Anhang

member

peptide  
library

SSGSRRTQSVNDDEE AT2G40490.1

member

peptide  
library

SSLIPRKTSSSLSCL AT4G24770.1

member

peptide  
library

SLLTKISSVSPQRI AT2G26540.1

member

peptide  
library

SSNALLKEPLLSVEK AT5G14910.1

member

peptide  
library

SSPFLESSSFSGDAA AT5G46110.1 AT5G4611 0.2 AT5G4611 0.3 AT5G46110.4

member

peptide  
library

SSPSRSFYGGSPGRL AT2G42975.1

member

peptide  
library

SSSKDKSDSDATVP AT1G50200.1

member

peptide  
library

SSSKFQNSITPLPKS AT2G35410.1

member

peptide  
library

SSSRAPSRERSFGG AT1G80300.1

member

peptide  
library

SSSRAPSRESFGGS AT1G15500.1

member

peptide  
library

SSSSSQSYSVPRTSN AT4G13430.1

member

peptide  
library

SSSSSSSQSYSVPRT AT3G25690.1 AT3G2569 0.2 AT3G2569 0.3

member

Anhang

peptide library member	SSTLLSISPRKSLSS	AT1G48620.1	
peptide library member	SSVDEAETAWEKFNR	AT5G36880.2	
peptide library member	SSVLYPASLKAGNDI	AT1G67090.1	AT1G6709 0.2
peptide library member	STHLLPLSKNLFRT	AT4G14870.1	
peptide library member	STQTGIGTGIAIAGV	AT3G46780.1	
peptide library member	STSDGYLSDGGGSRG	AT3G08940.1	AT3G0894 0.2
peptide library member	SVAVMPGSEPSETQW	AT2G20260.1	
peptide library member	SVEANNASEDGDVE	AT2G35490.1	
peptide library member	SVKIPVVSQDESGNG	AT1G19870.1	
peptide library member	SVKIPVVSQEDAPSG	AT4G20360.1	
peptide library member	SVPFEPVYSDGNASF	AT4G02510.1	
peptide library member	SVQSSPSRSFYGGSP	AT4G28730.1	



Anhang

peptide library member	SVSGGVETVKRRGRP	AT1G68830.1					
peptide library member	SVVSSSGSLDPKISG	AT5G53170.1					
peptide library member	SYLPDLTDSELAKEV	AT5G65780.2					
peptide library member	TAGSESESEATPSPA	AT1G08640.1					
peptide library member	TAIQNASETPKVQVA	ATCG00490.1					
peptide library member	TARFGFGTKKASPCK	AT1G19870.1					
peptide library member	TASSDSSSTTAAAAP	ATCG00270.1					
protein- control peptide library member	Tau	AT1G12900.1	AT1G1290 0.2	AT1G1290 .3	AT1G1290 .4	AT1G42970 .1	AT3G26650. 1
peptide library member	TDEWGEKSGPELEES	AT3G52930.1					
peptide library member	TDIDSPDTTNTIKDH	AT1G74640.1					
peptide library member	TDVTGKVTKIMNDKD	AT4G19490.1	AT4G1949 0.2				
peptide library member	TEEMIFGSSEAAKQF	AT4G11960.1					
peptide library	TENTVVIYSKTWCSY	ATCG00120.1					

Anhang

member

peptide  
library  
member

TETIDEISDGRKTVW AT3G53130.1

peptide  
library  
member

TEVSELETNDRFVGG AT1G12900.1 AT1G1290  
0.2 AT1G1290  
0.3 AT1G1290  
.4 AT1G42970  
.1 AT3G26650.  
1

peptide  
library  
member

TEVTNKVTTLDCESES AT4G33580.1 AT4G3358  
0.2

peptide  
library  
member

TFGSFKVSKDIKYAD AT1G06680.1 AT1G0668  
0.2

peptide  
library  
member

TGEIKGHYLNATAGT AT5G08540.1

peptide  
library  
member

THHEPVISTPDSKKR AT3G46780.1

peptide  
library  
member

TIALGKFTKDEKDLF AT2G31170.1

peptide  
library  
member

TIGKRLASINVENVE AT2G21170.1 AT2G2117  
0.2

peptide  
library  
member

TKQKGSRYVPAFLT AT3G18890.1

peptide  
library  
member

TKSISDASSQSLSSI AT1G48860.1 AT1G4886  
0.2 AT2G4530  
0.1

peptide  
library  
member

TLLPLKASTDQSGQV AT5G42650.1

Anhang

peptide library member	TLTAEAESFLKEGIQ	AT1G67090.1					
peptide library member	TLRTLSSGKNDESG	AT1G19870.1					
peptide library member	TMTTTHSYTGDQRLL	AT5G36700.1	AT5G3670 0.2	AT5G3670 0.4	AT5G36790 .1	AT5G36790 .2	AT5G36790. 3
peptide library member	TNLQVMASGKTPGLT	AT4G33650.1	AT4G3365 0.2				
peptide library member	TNTDFLPYNGDGFKV	AT5G08280.1					
peptide library member	TPAAKNSSVEEETE	AT4G25910.1					
peptide library member	TPKVQVATVRGQAKA	ATCG00480.1					
peptide library member	TQLRRCFTTLSSLTD	ATCG00480.1					
peptide library member	TRIIYGGSVNGGNSA	AT3G47070.1					
peptide library member	TRKSDSLSPGPTDSD	ATCG00710.1					
peptide library member	TRKTFPDYFQVLERI	AT1G48620.1					
peptide library member	TRPIKASGSETPDLT	ATCG00490.1					

Anhang

peptide library member	TRQVQCISFIAYKPP	AT1G23740.1		
peptide library member	TSEVEMASKVEPEES	AT3G48870.1	AT3G4887 0.2	AT5G5092 0.1
peptide library member	TSKISDFLSPKAATV	AT3G47070.1		
peptide library member	TSQVKRSRFLGRQAN	AT4G02510.1		
peptide library member	TTGDKILSQPLADIG	AT2G28800.1	AT2G2880 0.4	
peptide library member	TTMNLSTAEKNPN	AT2G32040.1		
peptide library member	TTSNPEVSIREKKNL	AT3G52150.1	AT3G5215 0.2	
peptide library member	TTSPIHKSAPAFIEL	AT2G28800.1	AT2G2880 0.4	
peptide library member	TTTGGRGTVRGGKNS	AT4G04020.1		
peptide library member	TVEDSSRSGPRSTTV	ATCG00280.1		
peptide library member	TVKPAASVSGGVETV	AT4G04020.1		
peptide library member	TYYTPEYETKDTDIL	AT1G06680.1	AT1G0668 0.2	

Anhang

peptide library member	VALTGAVTPPGFRFV	AT3G27160.1		
peptide library member	VAVEIPFTPRAKRVL	AT4G02510.1		
peptide library member	VDEKEGTTTGGRGTV	AT2G46820.1	AT2G4682 0.2	
peptide library member	VEELPVSESLKVGSV	AT4G22890.1	AT4G2289 0.2	AT4G22890. 3
peptide library member	VEESQSESEEGSDDE	AT4G11960.1		
peptide library member	VEGDRDTTSSIRTQP	AT1G17745.1	AT1G1774 5.2	
peptide library member	VEKVQVMYDKYSGRS	ATCG00490.1		
peptide library member	VELVEESQSESEEGS	AT4G18480.1		
peptide library member	VERVFASSSTVSVAD	AT1G42970.1		
peptide library member	VETLFNGTLALAGR	AT1G79050.1		
peptide library member	VFASSSTVSVADKAI	AT1G29930.1		
peptide library member	VFGKPKTNTDFLPYN	AT1G22700.1	AT1G2270 0.2	AT1G2270 0.3

## Anhang

peptide library member	VFVEDNESEERLVNR	AT4G15530.1	AT4G1553 0.2	AT4G1553 0.3	AT4G1553 0.4	AT4G1553 0.5	AT4G15530. 6
peptide library member	VGADDLSDSEKEKPN	AT1G36390.1	AT1G3639 0.2				
peptide library member	VGEAPATTTEAETTE	AT5G14740.1	AT5G1474 0.2	AT5G1474 0.3	AT5G1474 0.4	AT5G1474 0.5	
peptide library member	VGGDNVDSNVLPYCS	AT1G76080.1					
peptide library member	VGGEEVDSKILPYCS	AT5G48300.1					
peptide library member	VGSDSDEYNPTLPKP	AT3G25480.1					
peptide library member	VKEYKLTYYTPEYET	AT5G11670.1					
peptide library member	VKISRVCSSELNVDGL	AT1G29910.1	AT1G2992 0.1				
peptide library member	VKIVDNETISVDGKL	AT5G23890.1					
peptide library member	VKKGSWYSYEDQRLG	AT4G03520.1	AT4G0352 0.2				
peptide library member	VKLSPAASEVLGSGR	AT3G56690.1					
peptide library member	VKLYKGVVAVKSKKR	ATCG00480.1					

Anhang

peptide library member	VKNDTDLAADLKEL	AT2G40100.1	AT2G4010 0.2				
peptide library member	VKTLIRSYKQALLNG	AT3G52150.1	AT3G5215 0.2				
peptide library member	VLAESESSAFEDQCG	AT2G48120.1	AT2G4812 0.2				
peptide library member	VLKLSRSMSETVVFA	ATCG01110.1					
peptide library member	VLTQFNSASLNRHLS	AT1G74070.1					
peptide library member	VMFYLRKYKPISAMN	AT3G01500.1	AT3G0150 0.2	AT3G0150 0.3	AT5G14740 .1	AT5G14740 .2	AT5G14740. 4
peptide library member	VMHNLQYTVPLQRY	AT3G27925.1					
peptide library member	VNLSPAASEVLGSGR	AT1G15500.1					
peptide library member	VPESTDGSKDELNIY	AT5G66190.1					
peptide library member	VPKTTLTSSLDKFLP	AT5G21930.1	AT5G2193 0.2	AT5G2193 0.3			
peptide library member	VPSSTQRSDILHIIL	AT5G42080.1	AT5G4208 0.3				
peptide library member	VQAGSEVSALLGRMP	AT1G19870.1					

## Anhang

peptide library member	VQARFGFSFGKKKPA	AT1G06680.1	AT1G0668 0.2
peptide library member	VQVMYDKYSGRSRRF	AT4G02510.1	
peptide library member	VRIEEDATTGSKGEG	AT5G65780.2	
peptide library member	VRLSEMTESIKIIQQ	AT5G24490.1	
peptide library member	VSGKAGITYRRKDFV	AT5G16715.1	
peptide library member	VSLANLLTYPFVREG	AT5G35170.1	AT5G3517 0.2
peptide library member	VSNQSDLYRILDQCK	AT2G28000.1	
peptide library member	VSQEDAPSGETTSQL	AT2G20260.1	
peptide library member	VSVKAQVTTDTTEAP	AT3G12780.1	
peptide library member	VTADTAESLAKRLTE	AT1G59870.1	
peptide library member	VTNAAIESLDKMREG	AT1G67090.1	
peptide library member	VTNGKQVSPRIQRSA	AT4G13430.1	
peptide library member	VTPTDKKSITDYGSP	AT1G15820.1	



Anhang

peptide library member	VTRVDGSESEEEETEE	AT4G08510.1		
peptide library member	VTTLDCESESPSEAGR	AT2G35500.1		
peptide library member	VVEDVEDSTDSSVGE	AT3G60750.1	AT3G6075 0.2	
peptide library member	VVEKMLASEGIKRVD	AT3G25690.1	AT3G2569 0.2	AT3G25690. 3
peptide library member	VVFEETQTLLSQIQL	AT5G26742.1	AT5G2674 2.2	AT5G26742. 3
peptide library member	VVLDEFGSPKVVNDG	AT4G30950.1		
peptide library member	VVRAAEDTPPATASS	AT1G79460.1		
peptide library member	VVSMAKKSVGDLTSA	AT3G04790.1		
peptide library member	VYGNQLMSKEVDVTK	AT4G21280.1	AT4G2128 0.2	
peptide library member	VYREHGNSPGYYDGR	AT3G08940.1	AT3G08940 .2	
peptide library	VYSDGNASFVADYRF	ATCG00490.1		

Anhang

member

peptide library member	WATPWSKTAENFANY	AT4G21280.1	AT4G21280 .2	
peptide library member	WCKKFKPSLLQKLPI	AT2G42975.1		
peptide library member	WDPTHAKSVAQASLS	AT1G09130.1	AT1G09130 .2	AT1G09130. 3
peptide library member	WEKALPTYTPESPGD	AT4G01690.1	AT4G01690 .2	
peptide library member	WGKSKDDSSVQSSPS	AT5G16010.1		
peptide library member	WLIGGRSSSSSRAPS	AT1G74640.1		
peptide library member	WNWRLMKTIMTVCHV	AT4G33760.1		
peptide library member	YARDLNLTIPLGSEV	ATCG01000.1	ATCG0113 0.1	
member	YDIVGIPTSKRTEEQ			
member	YDLNTIISSEKPKDEK			
member	YGEVIGTRTEAVDPK			
member	YLNATAGTCEEMIKR			
member	YLRIDLNTIISSEKPK			
member	YLSGGGSRGLTIRD			
member	YNEHRPRTPPDLPS			
member	YPKEAIRTECLIDGE			
member	YSKFGVSSSSPQPQK			
member	YVPAAFLTGLLDPVS			

Anhang

member  
member

YVVLVEGTVRSRPNE  
YYLGRIPSPIFTKKL

Tabelle 37: für die LC-MS Messungen verwendete LC-Parameter.

<b>UPLC</b>		
<u>Injektor:</u>		
Injektionsvolumen IPC:	5	µL
Injektionsvolumen RP:	0.5	µL
Injektionsmodus:	partial loop	
Größe des <i>loops</i> :	10	µL
schwaches	20% MeOH	
Waschlösungsmittel:		
schwaches	600	µL
Waschvolumen:		
starkes	80% MeOH	
Waschlösungsmittel:		
starkes Waschvolumen:	200	µL
Probentemperatur:	4	°C
<u>Temperatur und Gradientenparameter ( für IPC und RP):</u>		
Säulentemperatur:	40	°C
UPLC Säulentyp:	Nucleoshell RP18 (2.7 µm x 2.1 mm x 150 mm)	
Flußrate:	400	µL/min
<i>UPLC Analyse hydrophiler Metabolite mittels IPC:</i>		
Lösungsmittel A:	10 mM wäßriges Tributylamine angesäuert auf pH 6.2 with Eisessig	
Lösungsmittel B:	Acetonitrile	(LC-MS grade)
Gradientenprogramm		
min	%B	
0	2	
2	2	
18	36	
21	95	
22.5	95	
22.51	2	
24	2	
<i>UPLC Analyse semipolarer Metabolite mittels RP-UPLC:</i>		

Anhang

Lösungsmittel A: 0.3 mM wäßrige ammoniumformiat, angesäuert mit Ameisensäure auf pH 3

Lösungsmittel B: Acetonitril (LC-MS grade)

Gradientenprogramm

min	%B
0	5
2	5
19	95
22	95
22.01	5
24	5

Alle Lösungen und Modifizierungsagentien wurden von Sigma-Aldrich erworben.

---

*Tabelle 38: MS Parameter für die gerichtete Analyse hydrophiler und semipolarer Metabolite mit (-)ESI-SWATH-MS/MS*

---

<u>MS source parameters</u>		
curtain gas	35	arbitrary units
gas 1	60	psi
gas 2	70	psi
ionisation	-4500	V
needle voltage		
source temperature	600	°C
Source	DuoSpray	
Housing:	Ion Source	

SWATH MS and

MS/MS parameters:

MS1 Index:	Exp	Start Mass (Da)	Stop Mass (Da)	declusterin g potential [V]	entranc e potentia l [V]	collisio n energy [V]	collisio n energy spread	dwel l time [ms]
TOF Exp 1:	65	1250	-35	-10	-10	-	150	
SWATH Exp Index:	Start Mass (Da)	Stop Mass (Da)	declusterin g potential [V]	entranc e potentia l [V]	collisio n energy [V]	collisio n energy spread	dwel l time [ms]	
SWATH Exp 1:	65	97.03	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 2:	96.03	129.06	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 3:	128.06	161.09	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 4:	160.09	193.12	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 5:	192.12	225.15	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 6:	224.15	257.18	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 7:	256.18	289.21	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 8:	288.21	321.24	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 9:	320.24	353.27	-35	-10	-45	35	20	
SWATH Exp 10:	352.27	385.3	-35	-10	-45	35	20	

Anhang

SWATH	384.3	417.33	-35	-10	-45	35	20
Exp 11:							
SWATH	416.33	449.36	-35	-10	-45	35	20
Exp 12:							
SWATH	448.36	481.39	-35	-10	-45	35	20
Exp 13:							
SWATH	480.39	513.42	-35	-10	-45	35	20
Exp 14:							
SWATH	512.42	545.45	-35	-10	-45	35	20
Exp 15:							
SWATH	544.45	577.48	-35	-10	-45	35	20
Exp 16:							
SWATH	576.48	609.51	-35	-10	-45	35	20
Exp 17:							
SWATH	608.51	641.54	-35	-10	-45	35	20
Exp 18:							
SWATH	640.54	673.57	-35	-10	-45	35	20
Exp 19:							
SWATH	672.57	705.6	-35	-10	-45	35	20
Exp 20:							
SWATH	704.6	737.63	-35	-10	-45	35	20
Exp 21:							
SWATH	736.63	769.66	-35	-10	-45	35	20
Exp 22:							
SWATH	768.66	801.69	-35	-10	-45	35	20
Exp 23:							
SWATH	800.69	833.72	-35	-10	-45	35	20
Exp 24:							
SWATH	832.72	865.75	-35	-10	-45	35	20
Exp 25:							
SWATH	864.75	897.78	-35	-10	-45	35	20
Exp 26:							

Anhang

SWATH	896.78	929.81	-35	-10	-45	35	20
Exp 27:							
SWATH	928.81	961.84	-35	-10	-45	35	20
Exp 28:							
SWATH	960.84	993.87	-35	-10	-45	35	20
Exp 29:							
SWATH	992.87	1025.9	-35	-10	-45	35	20
Exp 30:							
SWATH	1024.9	1057.9	-35	-10	-45	35	20
Exp 31:		3					
SWATH	1056.93	1089.9	-35	-10	-45	35	20
Exp 32:		6					
SWATH	1088.96	1121.9	-35	-10	-45	35	20
Exp 33:		9					
SWATH	1120.99	1154.0	-35	-10	-45	35	20
Exp 34:		2					
SWATH	1153.02	1186.0	-35	-10	-45	35	20
Exp 35:		5					
SWATH	1185.05	1218.0	-35	-10	-45	35	20
Exp 36:		8					
SWATH	1217.08	1250	-35	-10	-45	35	20
Exp 37:							

Tabelle 39: Sequenz der für die MRM-Methode verwendeten schweren Peptide der CK2 (At2g23070)

**Sequenz der ausgewählten Peptide**

IELDPNLTSLVGR

TPSLIFEHVNNK

YSEVFEGIHATDNEK

FINSENQHLAVPEAVDFVDK



Anhang

Tabelle 40: In Silico Fragmentierung des ersten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.

AT2G23070.a		CK II heavey peptide		incl. Protonen		incl. OH/2 H+		incl. OH/2 H+			
				m/z	NP	m/z	NP	m/z	HP		
Sequenz	b-Ionen	y-Ionen		b-Ionen	Check	y-Ionen	Check	y-Ionen	Check		
IELDPNLTSLVGR	I	1	12	ELDPNLTSLVGR	114,0866			1.313,6537		1.323,6537	
	IE	2	11	LDPNLTSLVGR	243,1245			1.184,6158		1.194,6158	
<b>NP m/z [M+2H]<sup>2+</sup></b>	IEL	3	10	DPNLTSLVGR	356,2038			1.071,5365		1.081,5365	
713,8701465	IELD	4	9	PNLTSLVGR	471,2261			956,5142	+	966,5142	+
ok	IELDP	5	8	NLTSLVGR	568,2741			859,4662	+	869,4662	+
<b>HP m/z [M+2H]<sup>2+</sup></b>	IELDPN	6	7	LTSLVGR	682,3120			745,4283		755,4283	
718,8701465	IELDPNL	7	6	TSLVGR	795,3913			632,3490		642,3490	
	IELDPNLT	8	5	SLVGR	896,4342			531,3061	+	541,3061	+
	IELDPNLTS	9	4	LVGR	983,4616			444,2787		454,2787	
	IELDPNLTSL	10	3	VGR	1.096,5409			331,1994		341,1994	
	IELDPNLTSLV	11	2	GR	1.195,6046			232,1357	+	242,1357	+
	IELDPNLTSLVG	12	1	R	1.252,6213			175,1190		185,1190	

Anhang

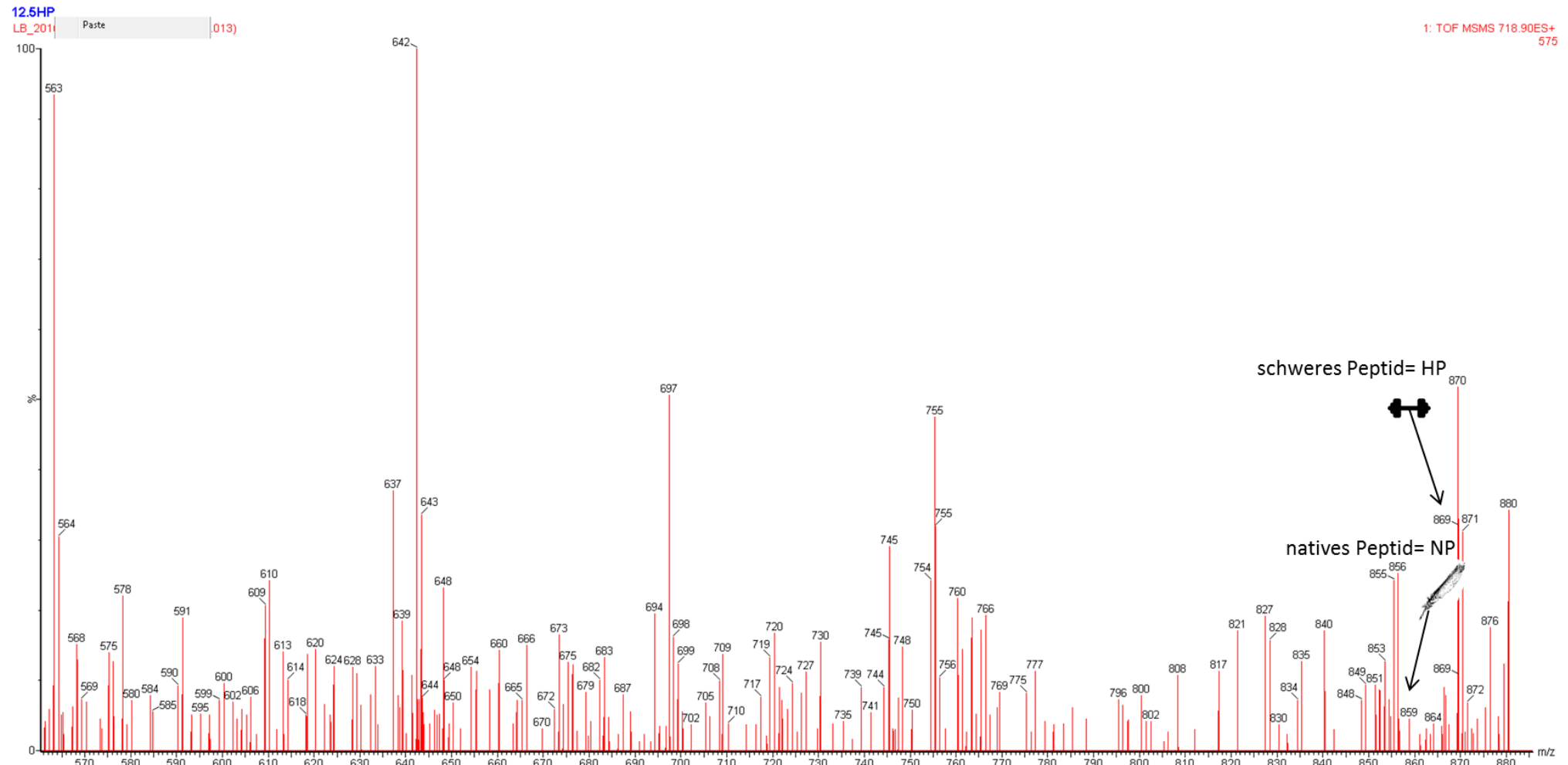


Abbildung 60: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp.

Anhang

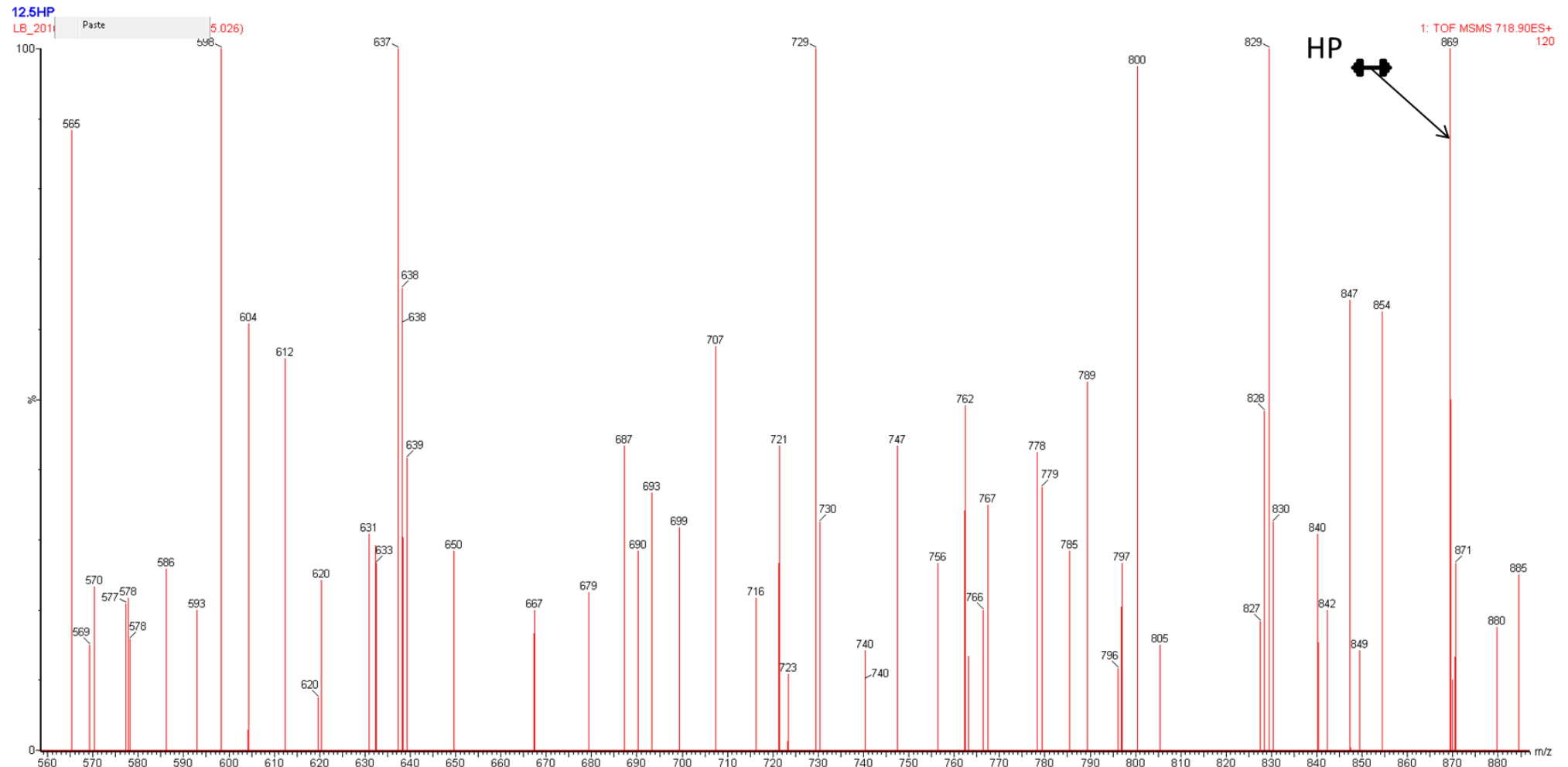


Abbildung 61: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) in der ck2-Mutante.

Anhang

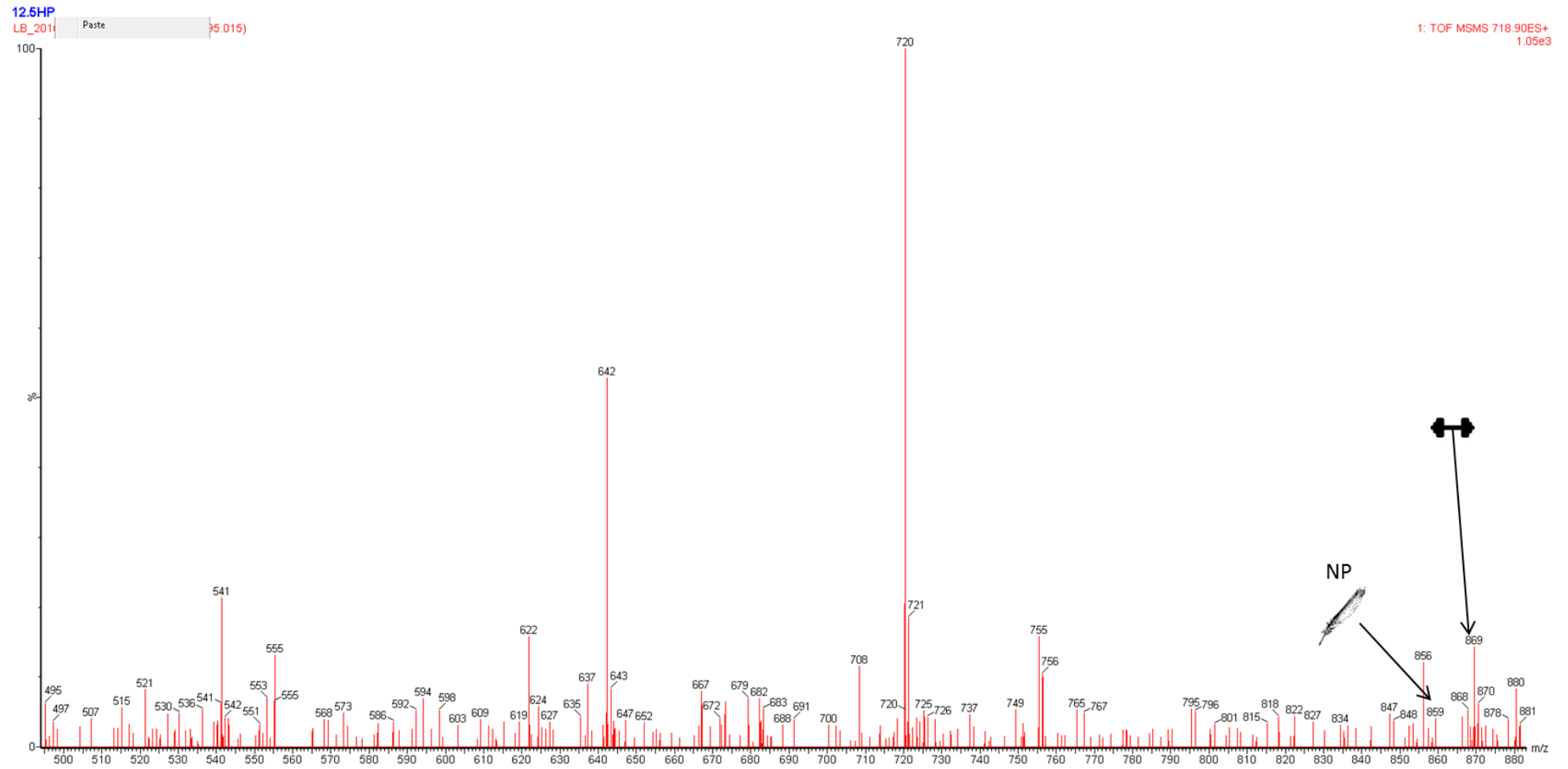


Abbildung 62: Spektrum b-Ion IELDP mit eingezeichneten schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) ind der komplementierten TAP-CK2 Pflanze.

# Anhang

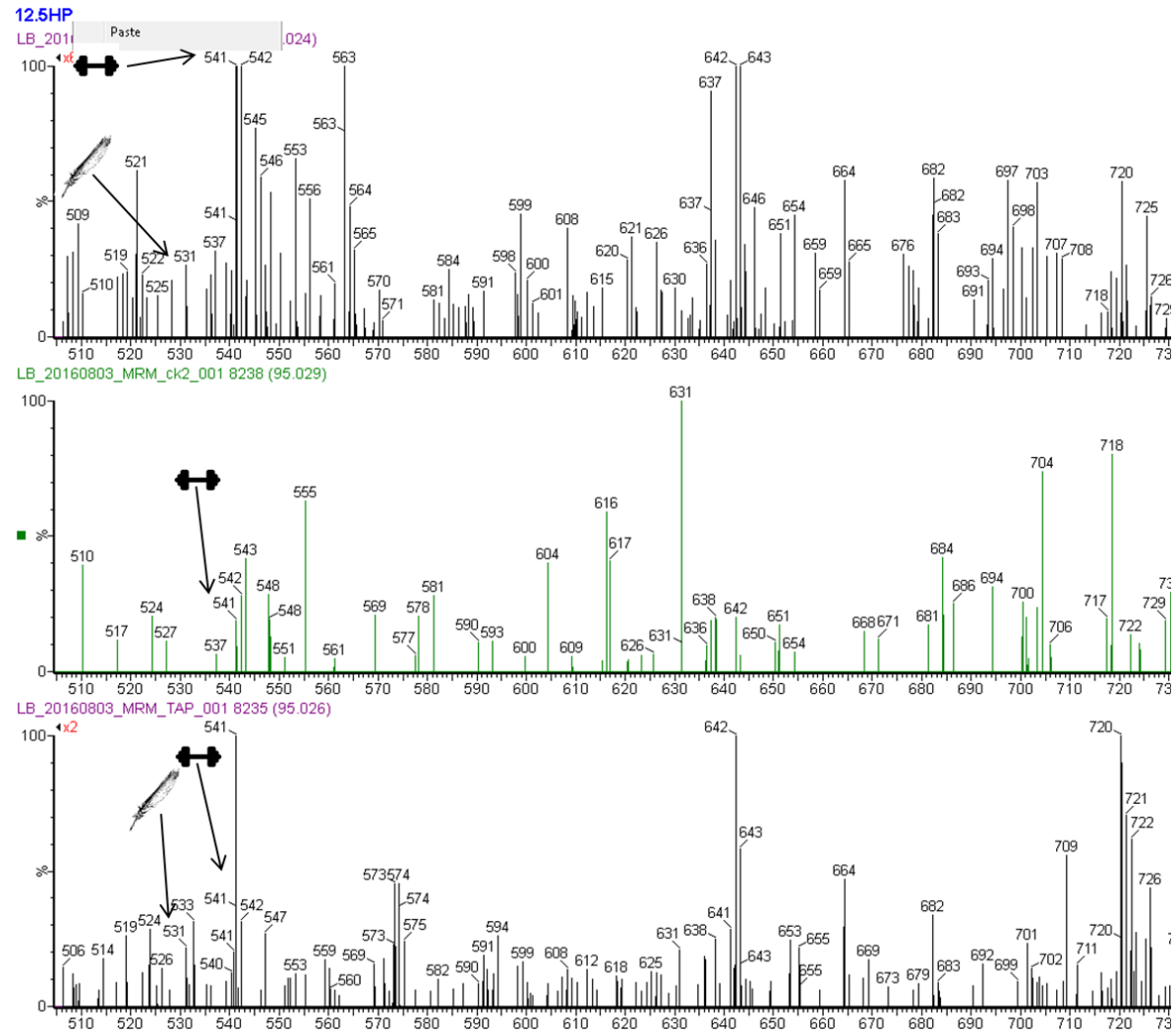


Abbildung 63: Spektrum b-Ion IELDPNLT mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (schwarz oben), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (schwarz unten).

Tabelle 41: In Silico Fragmentierung des zweiten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.

AT2G23070.b		CK II heavey peptide		incl. Protonen		incl. OH/2 H+		incl. OH/2 H+	
				m/z	NP	m/z	NP	m/z	HP
Sequenz	b-Ionen	y-Ionen		b-Ionen	Check	y-Ionen	Check	y-Ionen	Check
TPSLIFEHVNNK	T	1	11	PSLIFEHVNNK	102,0502		1.297,6422		1.305,6422
	TP	2	10	SLIFEHVNNK	199,0982		1.200,5942		1.208,5942
<b>NP m/z [M+2H]<sup>2+</sup></b>	TPS	3	9	LIFEHVNNK	286,1255		1.113,5668		1.121,5668
699,8461865	TPSL	4	8	IFEHVNNK	399,2049		1.000,4875		1.008,4875
	TPSLI	5	7	FEHVNNK	512,2842		887,4082		895,4082
<b>HP m/z [M+2H]<sup>2+</sup></b>	TPSLIF	6	6	EHVNNK	659,3479		740,3445		748,3445
703,8461865	TPSLIFE	7	5	HVNNK	788,3858		611,3066		619,3066
	TPSLIFEH	8	4	VNNK	925,4400		474,2523		482,2523
	TPSLIFEHV	9	3	NNK	1.024,5038		375,1886		383,1886
	TPSLIFEHVN	10	2	NK	1.138,5417		261,1507		269,1507
	TPSLIFEHVNN	11	1	K	1.252,5796		147,1128		155,1128

Tabelle 42: In Silico Fragmentierung des dritten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.

AT2G23070.c		CK II heavey peptide		incl. Protonen		incl. OH/2 H+		incl. OH/2 H+			
				m/z	NP	m/z	NP	m/z	HP		
Sequenz	b-Ionen		y-Ionen	b-Ionen	Check	y-Ionen	Check	y-Ionen	Check		
YSEVFEGIHATDNEK	Y	1	14	SEVFEGIHATDNEK	164,0659			1.575,6670		1.583,6670	
	YS	2	13	EVFEGIHATDNEK	251,0932			1.488,6397		1.496,6397	
	YSE	3	12	VFEGIHATDNEK	380,1311			1.359,6018		1.367,6018	
	YSEV	4	11	FEGIHATDNEK	479,1949			1.260,5381		1.268,5381	
	YSEVF	5	10	EGIHATDNEK	626,2586			1.113,4744		1.121,4744	
	YSEVFE	6	9	GIHATDNEK	755,2965			984,4364		992,4364	
	YSEVFEG	7	8	IHATDNEK	812,3132			927,4197		935,4197	
	YSEVFEGI	8	7	HATDNEK	925,3925			814,3404		822,3404	
	YSEVFEGIH	9	6	ATDNEK	1.062,4468			677,2862		685,2862	
	YSEVFEGIHA	10	5	TDNEK	1.133,4792			606,2538		614,2538	
	YSEVFEGIHAT	11	4	DNEK	1.234,5221			505,2108		513,2108	
	YSEVFEGIHATD	12	3	NEK	1.349,5443			390,1886		398,1886	
	YSEVFEGIHATDN	13	2	EK	1.463,5822			276,1507		284,1507	
	YSEVFEGIHATDNE	14	1	K	1.592,6202			147,1128		155,1128	

Tabelle 43: In Silico Fragmentierung des vierten für die MRM- Methode verwendeten Peptids.

AT2G23070.d		CK II heavy peptide		incl. Protonen		incl. OH/2 H+		incl. OH/2 H+		
Sequenz	b-Ionen		y-Ionen	b-Ionen	k	y-Ionen	k	m/z	HP	Chec
FINSENQHLAVPEAVDFVD		1	INSENQHLAVPEAVDFVD			2.124,970		2.132,970		
K	F	1 9	K	148,0710		6		6		
		1				2.011,891		2.019,891		
	FI	2 8	NSENQHLAVPEAVDFVDK	261,1503		3		3		
		1				1.897,853		1.905,853		
<b>NP m/z [M+2H]<sup>2+</sup></b>	FIN	3 7	SENQHLAVPEAVDFVDK	375,1882		4		4		
1136,520816		1				1.810,826		1.818,826		
	FINS	4 6	ENQHLAVPEAVDFVDK	462,2156		1		1		
		1				1.681,788		1.689,788		
	FINSE	5 5	NQHLAVPEAVDFVDK	591,2535		2		2		
		1				1.567,750		1.575,750		
<b>HP m/z [M+2H]<sup>2+</sup></b>	FINSEN	6 4	QHLAVPEAVDFVDK	705,2914		2		2		
1140,520816		1				1.439,696		1.447,696		
	FINSENQ	7 3	HLAVPEAVDFVDK	833,3452		4		4		
		1				1.302,642		1.310,642		
	FINSENQH	8 2	LAVPEAVDFVDK	970,3994		2		2		
		1		1.083,478		1.189,562		1.197,562		
	FINSENQHL	9 1	AVPEAVDFVDK	8		9		9		
		1 1		1.154,511		1.118,530		1.126,530		
	FINSENQHLA	0 0	VPEAVDFVDK	2		5	+	5	+	



	1			1.253,574		1.019,466		1.027,466	
FINSENQHLAV	1	9	PEAVDFVDK	9		7		7	
	1			1.350,622					
FINSENQHLAVP	2	8	EAVDFVDK	9		922,4187		930,4187	
	1			1.479,660					
FINSENQHLAVPE	3	7	AVDFVDK	8		793,3808	+	801,3808	+
	1			1.550,693					
FINSENQHLAVPEA	4	6	VDFVDK	3		722,3484	+	730,3484	+
	1			1.649,757					
FINSENQHLAVPEAV	5	5	DFVDK	0		623,2847	+	631,2847	+
	1			1.764,779					
FINSENQHLAVPEAVD	6	4	FVDK	2		508,2624		516,2624	
	1			1.911,842					
FINSENQHLAVPEAVDF	7	3	VDK	9		361,1987	+	369,1987	+
	1			2.010,906					
FINSENQHLAVPEAVDFV	8	2	DK	6		262,1350		270,1350	
FINSENQHLAVPEAVDFV	1			2.125,928					
D	9	1	K	9		147,1128		155,1128	

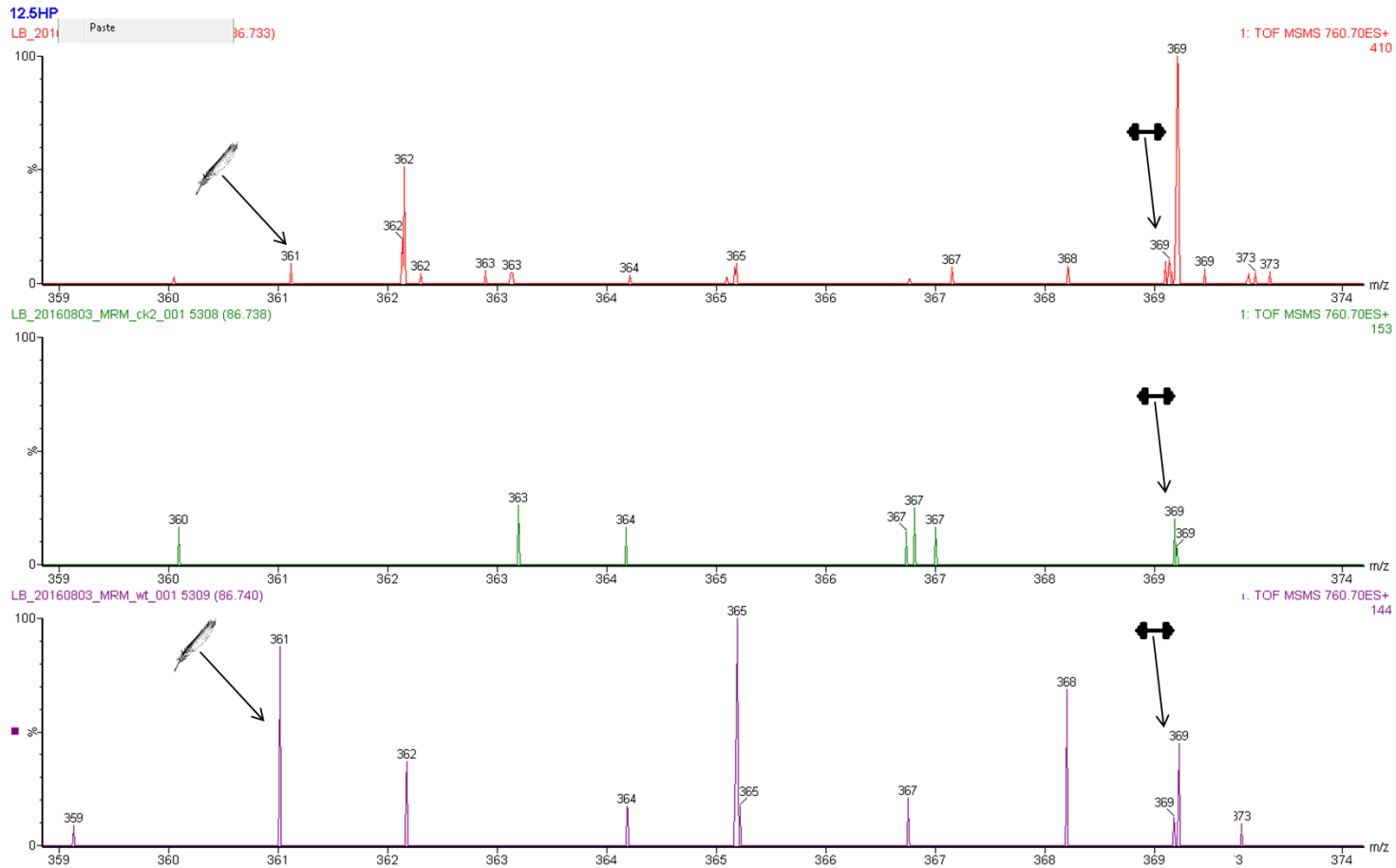


Abbildung 64: Spektrum b-Ion VDK mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).

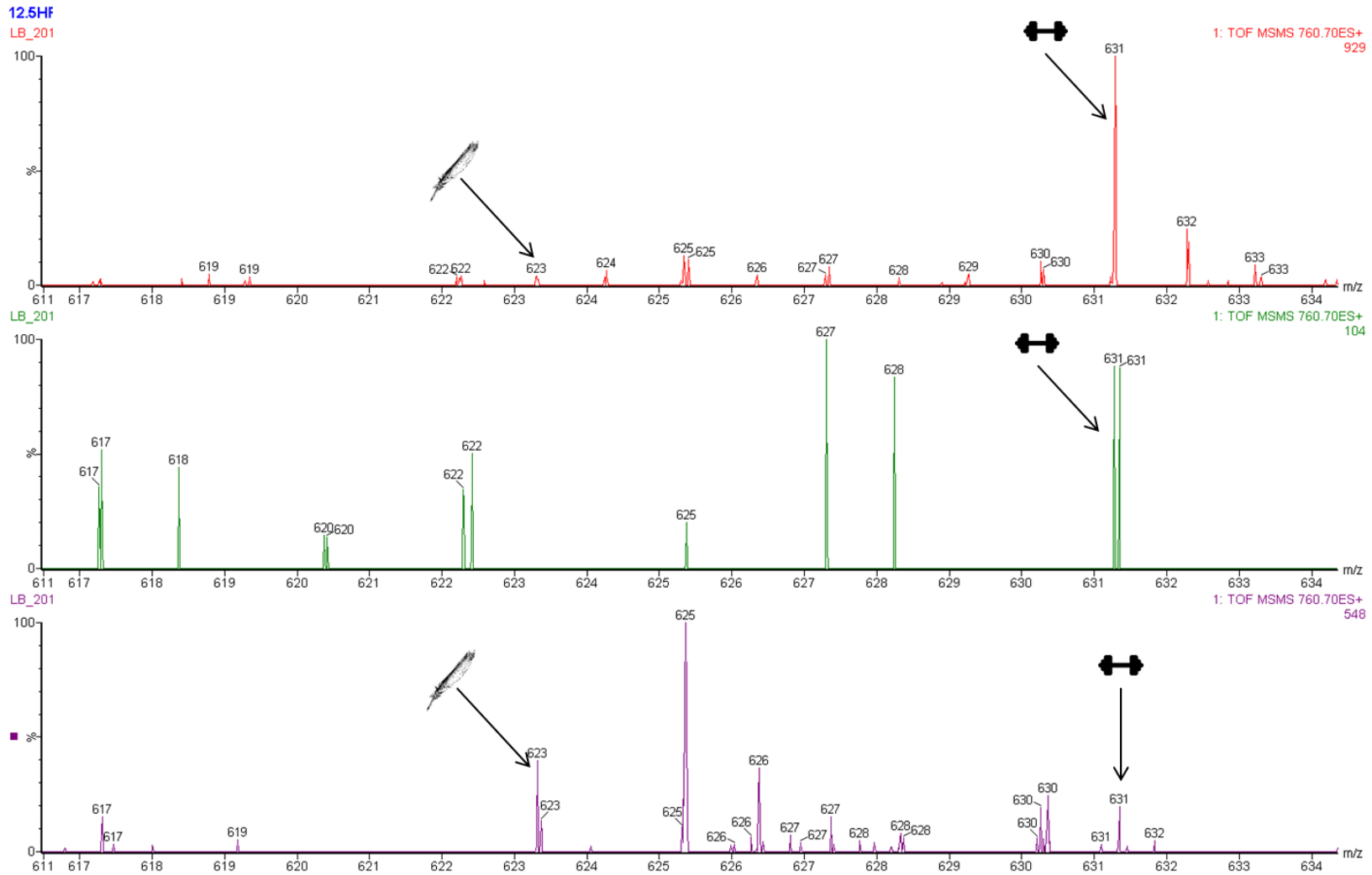


Abbildung 65: Spektrum b-Ion DFVDK mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).

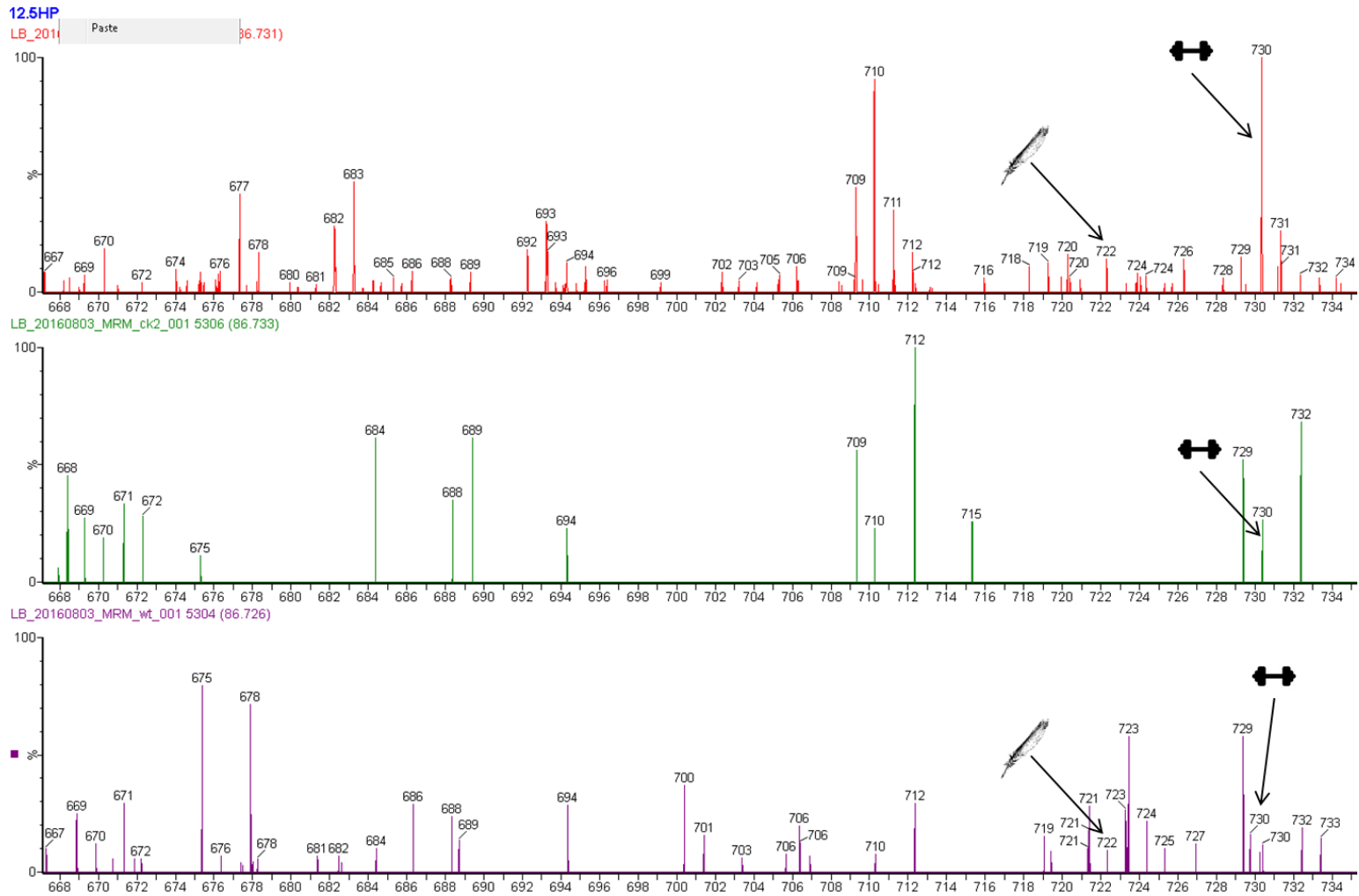


Abbildung 66: Spektrum b-Ion VDFVDK mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).

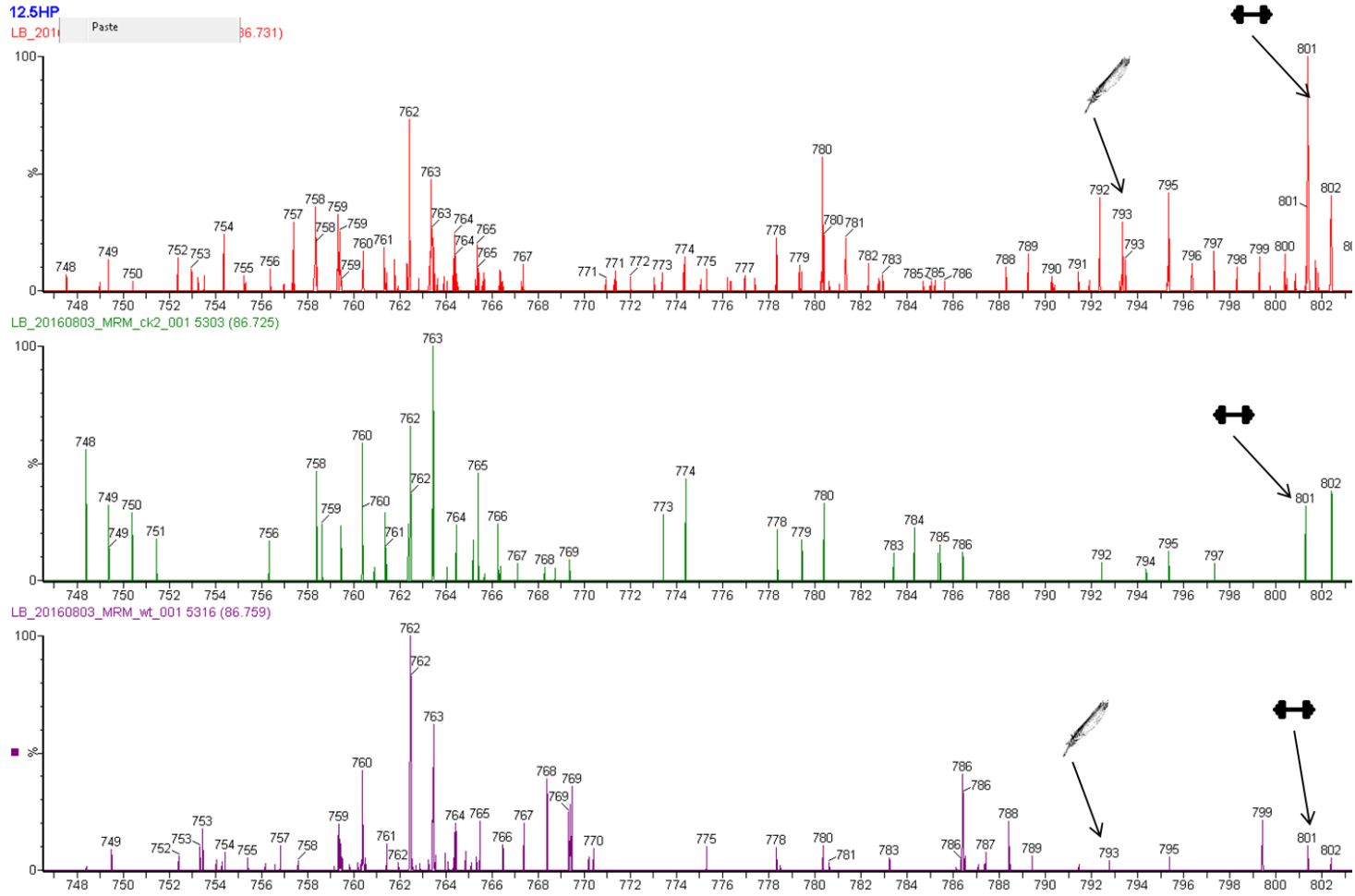


Abbildung 67: Spektrum *b*-lon AVDFVDK mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), *ck2*-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).

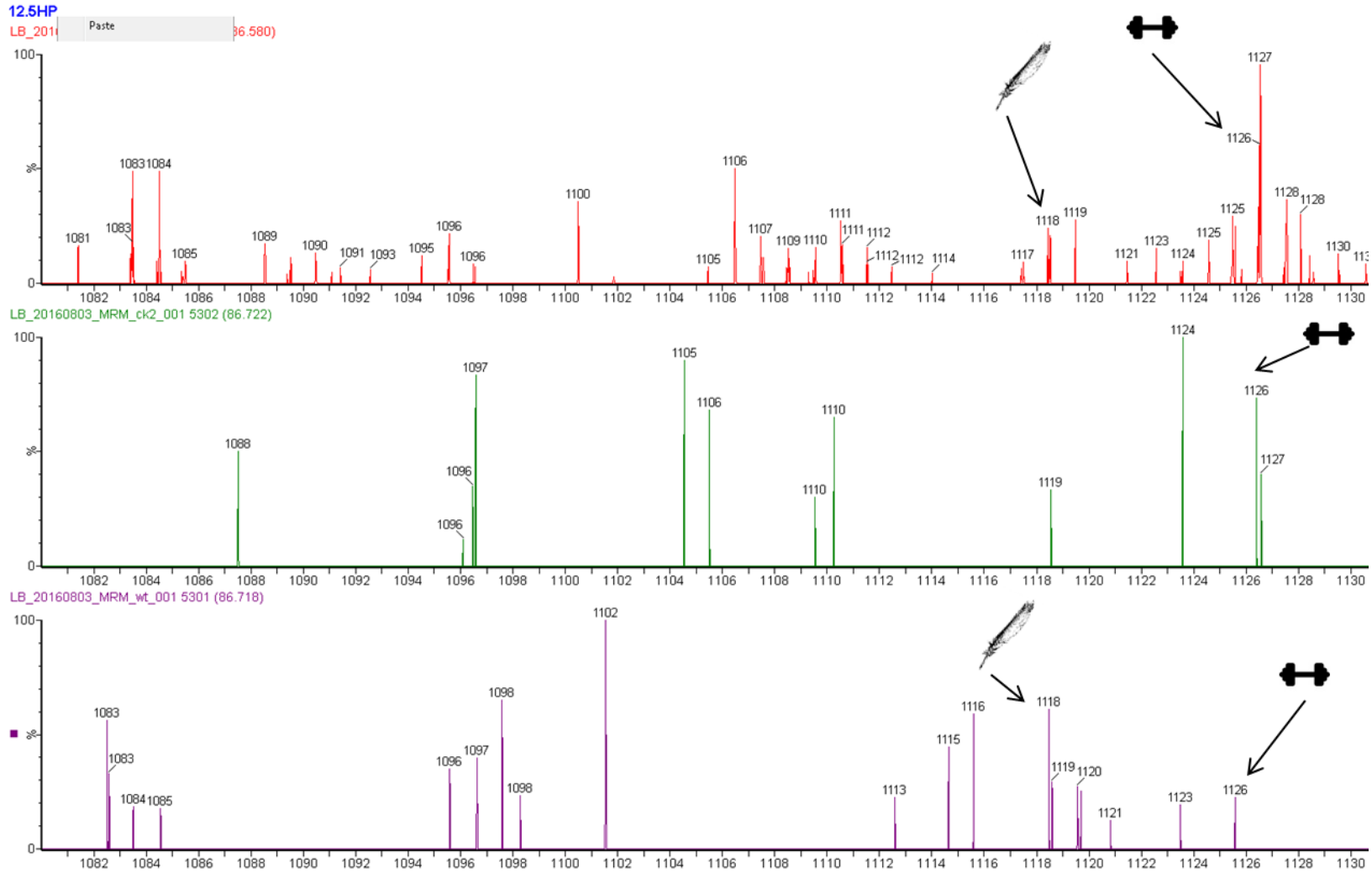


Abbildung 68: Spektrum b-Ion VPEAVDFVDK mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).

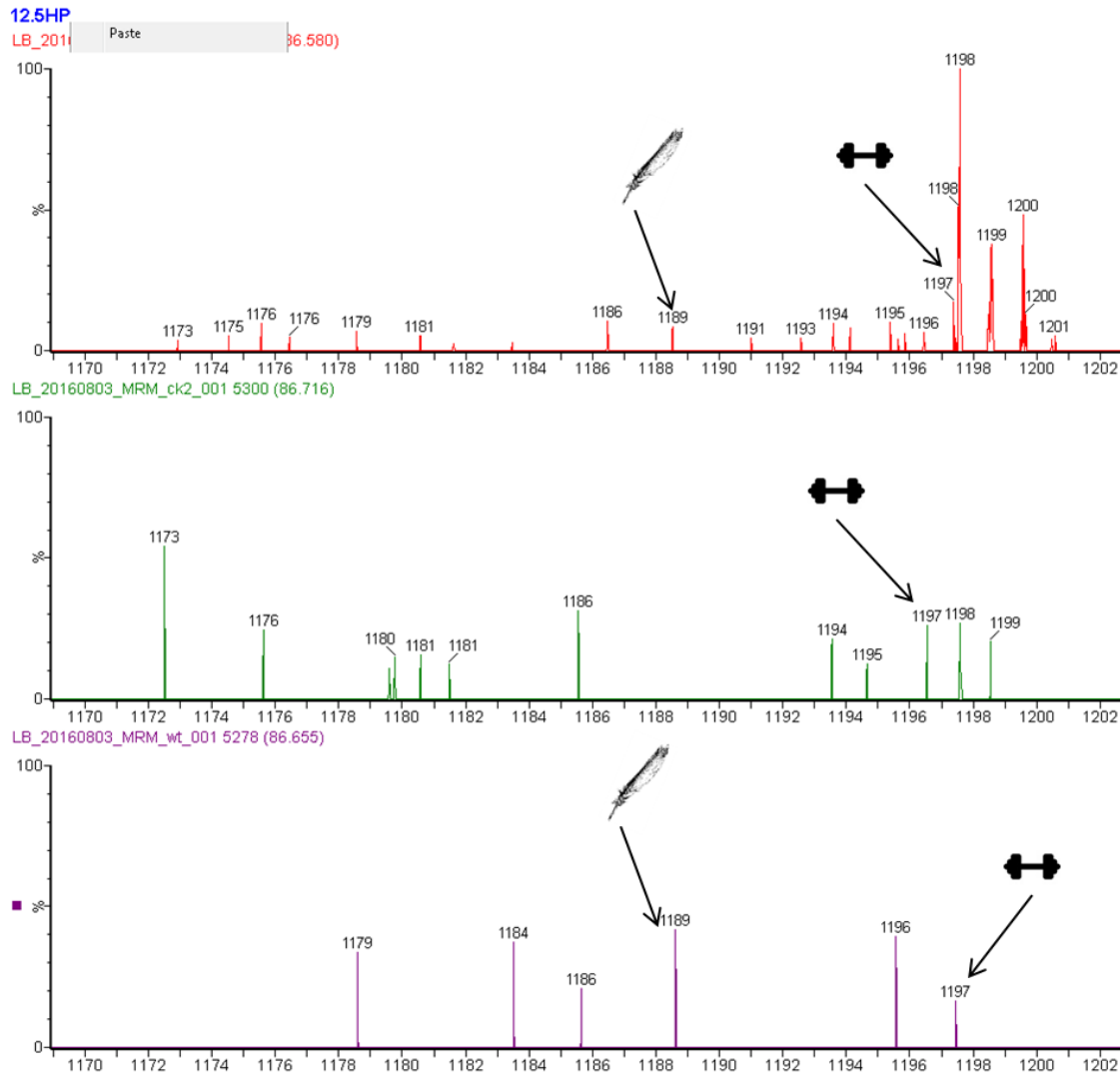


Abbildung 69: Spektrum b-Ion AVPEAVDFVDK mit eingezeichnetem schwerem Peptid (HP) und Normalpeptid (NP) im Wildtyp (rot), ck2-Mutante (grün) und der komplementierten TAP-CK2 (lila).





Clip 1 BQ 20 WL 10 Sequence: 185\_prelix

Clipped length: 921  
Left clip: 23  
Right clip: 943  
Avg. qual. in clip: 47.94

Samples: 12965  
Bases: 1065  
Average spacing: 13.0  
Average quality >= 10: 62, 20: 121, 30: 842

Quality: 0 - 9  
10 - 19  
20 - 29  
>= 30

Page: 2 / 3  
09.11.2012

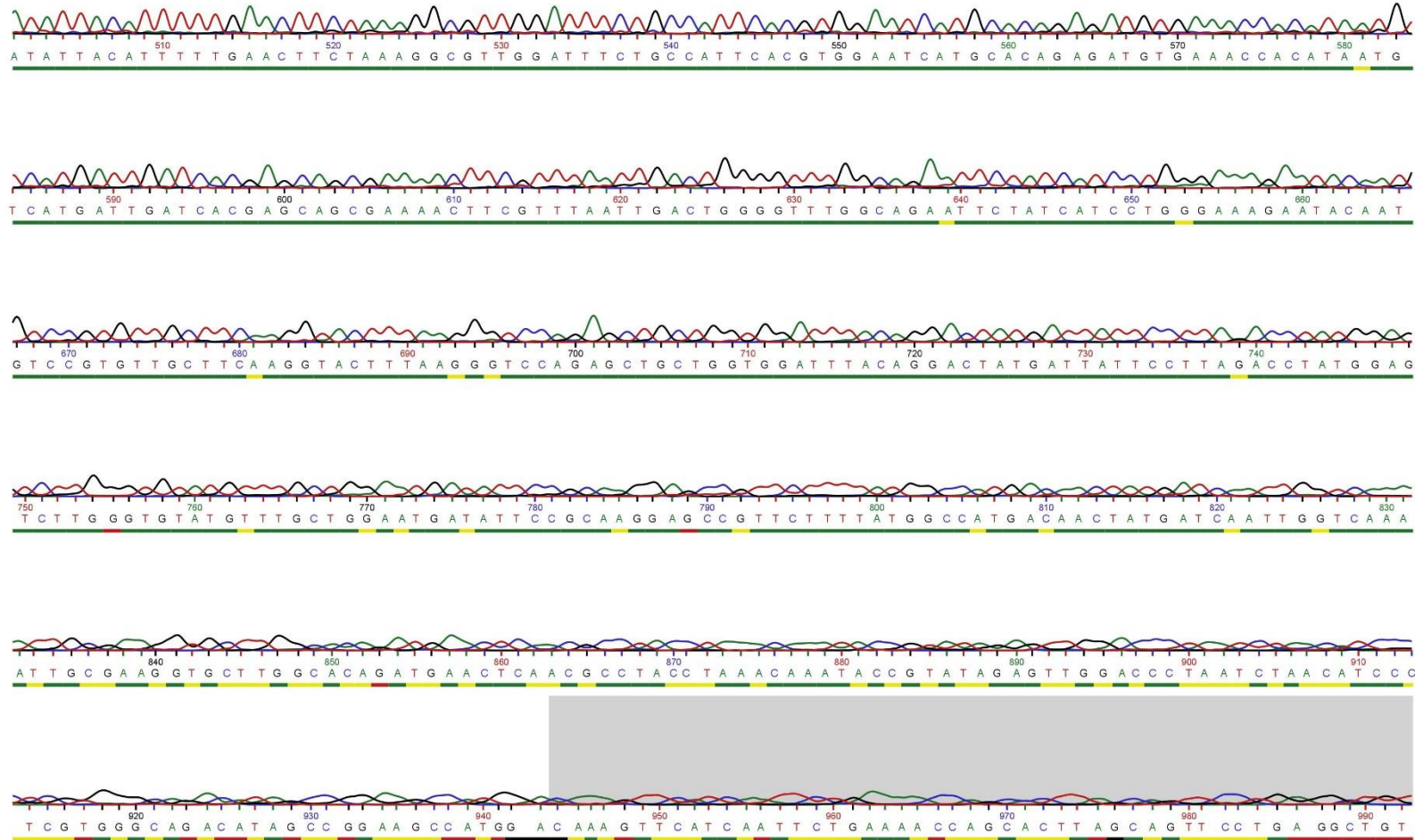
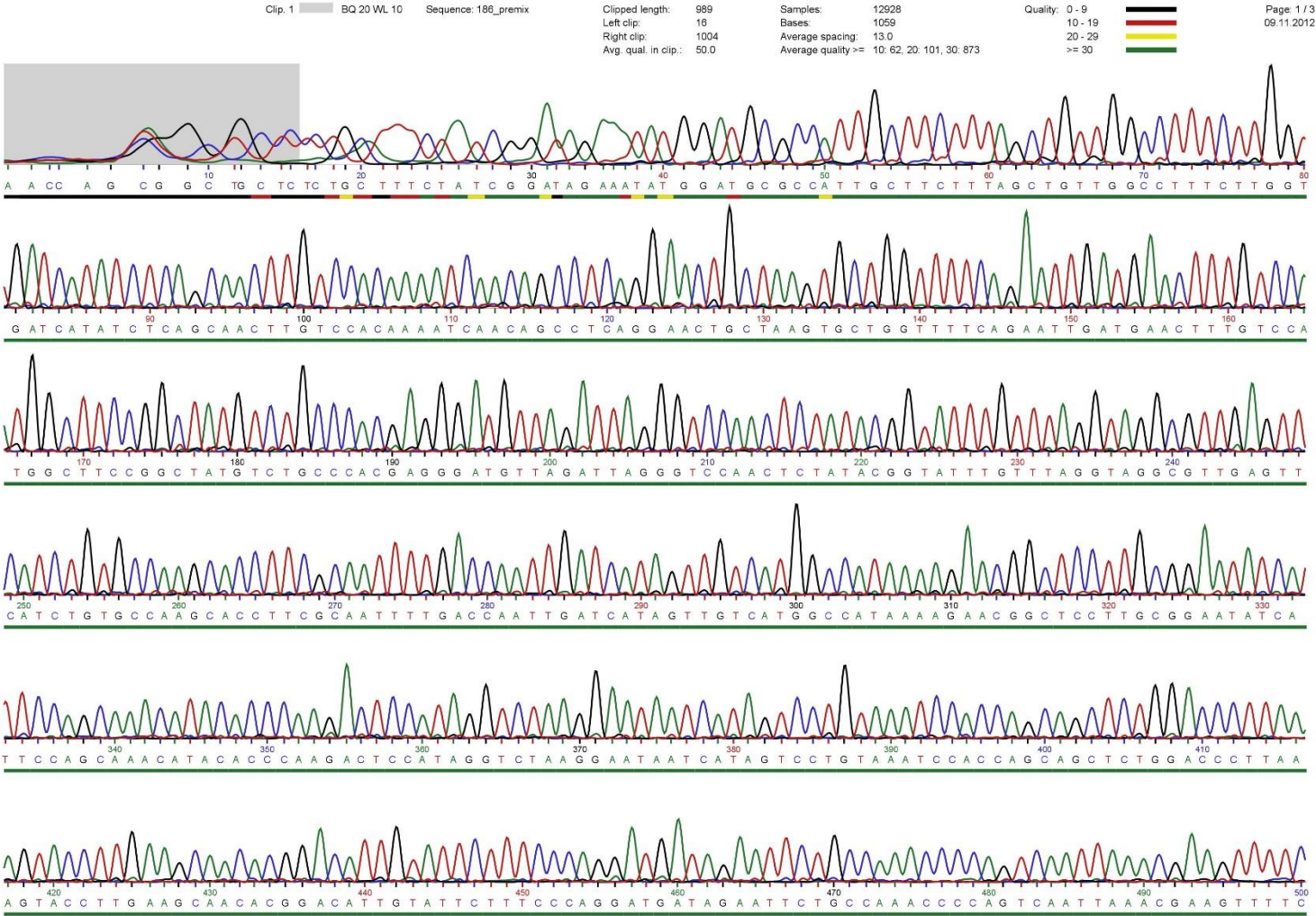


Abbildung 71: Sequenzierung des Vektors pMALc5x mit rekombinanter CK2. Rückwärtsprimer 5' → 3'-Richtung.



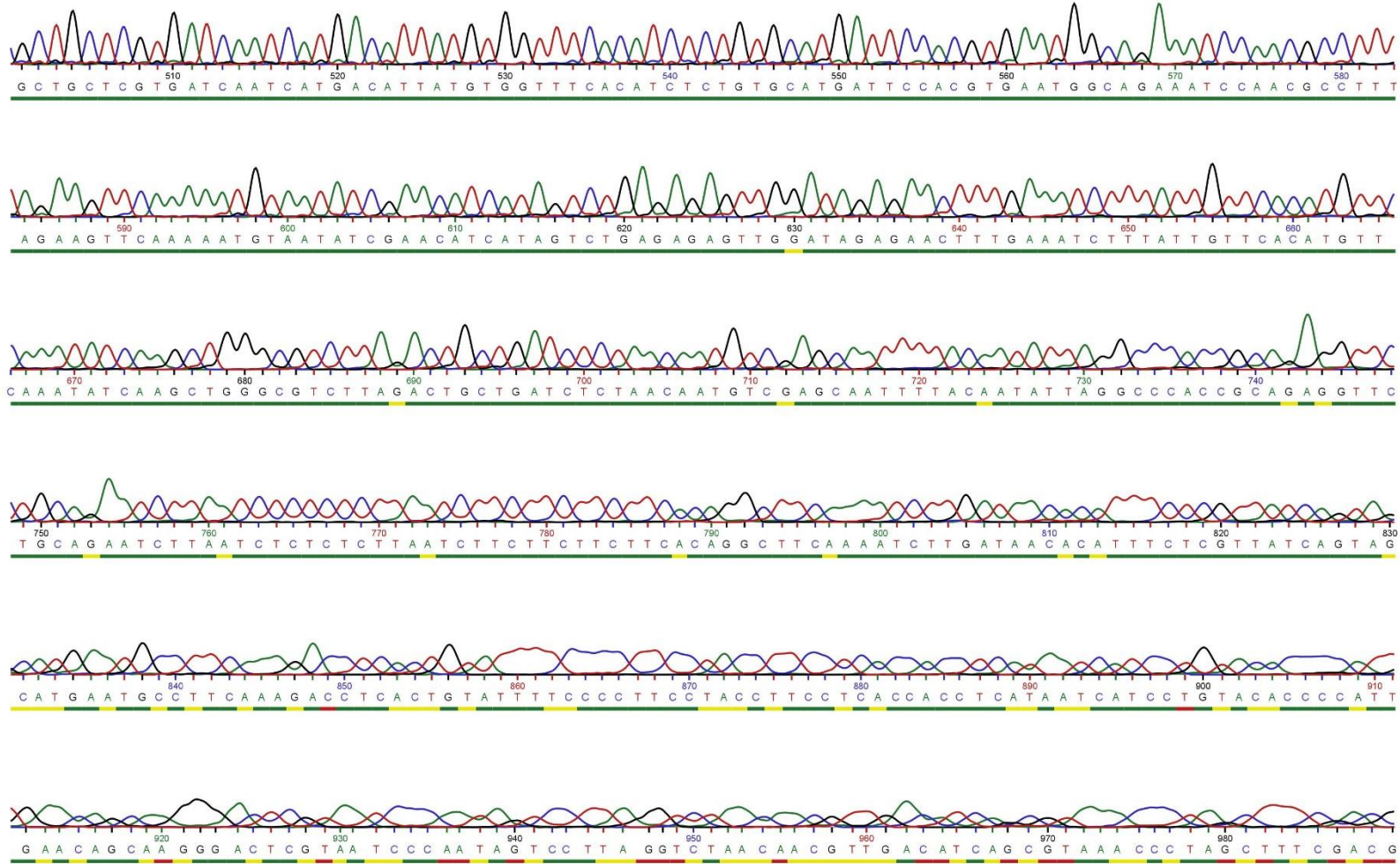
Clip: 1 BQ 20 WL 10 Sequence: 186\_premix

Clipped length: 989  
Left clip: 16  
Right clip: 1004  
Avg. qual. in clip: 50.0

Samples: 12928  
Bases: 1059  
Average spacing: 13.0  
Average quality >= 10: 62, 20: 101, 30: 873

Quality: 0 - 9  
10 - 19  
20 - 29  
>= 30

Page: 2 / 3  
09.11.2012



Component	R2X	R2X(cum)	Eigenvalue	R2	R2(cum)	Q2	Limit	Q2(cum)	R2Y	R2Y(cum)	EigenvalueY	Significance
Model		0.967		1				0.991	1			
Predictive		0.553		1				0.991	1			
P1	0.553	0.553	3.33	1	1	0.991	0.01	0.991	1	1	1	R1
Orthogonal in X(OPLS)		0.414		0								
O1	0.307	0.307	1.84	0	0							R1
O2	0.0397	0.347	0.238	0	0							R1
O3	0.0671	0.414	0.404	0	0							R1

## Literaturverzeichnis

Ackermann, Karin; Neidhart, Tanja; Gerber, Jochen; Waxmann, Andrea; Pyerin, Walter (2005): The catalytic subunit alpha' gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2). Genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator. In: *Molecular and cellular biochemistry* 274 (1-2), S. 91–101.

Agne, Birgit; Kessler, Felix (2009): Protein transport in organelles. The Toc complex way of preprotein import. In: *The FEBS journal* 276 (5), S. 1156–1165. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06873.x.

Ahmed, Khalil; Gerber, Delphine A.; Cochet, Claude (2002): Joining the cell survival squad. An emerging role for protein kinase CK2. In: *Trends in cell biology* 12 (5), S. 226–230.

Allende, J. E.; Allende, C. C. (1995): Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (5), S. 313–323.

Andrès, Charles; Agne, Birgit; Kessler, Felix (2011): Preparation of multiprotein complexes from Arabidopsis chloroplasts using tandem affinity purification. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 775, S. 31–49. DOI: 10.1007/978-1-61779-237-3\_3.

Atkinson, Daniel E. (1968): Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. In: *Biochemistry* 7 (11), S. 4030–4034. DOI: 10.1021/bi00851a033.

Austin, Jotham R.; Frost, Elizabeth; Vidi, Pierre-Alexandre; Kessler, Felix; Staehelin, L. Andrew (2006): Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. In: *The Plant cell* 18 (7), S. 1693–1703. DOI: 10.1105/tpc.105.039859.

Baerenfaller, Katja; Hirsch-Hoffmann, Matthias; Svozil, Julia; Hull, Roger; Russenberger, Doris; Bischof, Sylvain et al. (2011): pep2pro. A new tool for comprehensive proteome data analysis to reveal information about organ-specific proteomes in Arabidopsis thaliana. In: *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3 (3), S. 225–237. DOI: 10.1039/c0ib00078g.

Baginsky, Sacha; Gruissem, Wilhelm (2009): The chloroplast kinase network: new insights from large-scale phosphoproteome profiling. In: *Molecular plant* 2 (6), S. 1141–1153. DOI: 10.1093/mp/ssp058.

Bauer, J.; Chen, K.; Hiltbunner, A.; Wehrli, E.; Eugster, M.; Schnell, D.; Kessler, F. (2000): The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. In: *Nature* 403 (6766), S. 203–207. DOI: 10.1038/35003214.

Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Stryer, Lubert; Häcker, Bärbel (2011): Biochemie. Korr. Nachdr. der 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. Online verfügbar unter [http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2922186&prov=M&dok\\_var=1&dok\\_ext=htm](http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2922186&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm).

Bishop, A.; Buzko, O.; Heyeck-Dumas, S.; Jung, I.; Kraybill, B.; Liu, Y. et al. (2000): Unnatural ligands for engineered proteins. New tools for chemical genetics. In: *Annual*

*review of biophysics and biomolecular structure* 29, S. 577–606. DOI: 10.1146/annurev.biophys.29.1.577.

Bradford, M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.

Bréhélin, Claire; Kessler, Felix; van Wijk, Klaas J. (2007): Plastoglobules. Versatile lipoprotein particles in plastids. In: *Trends in plant science* 12 (6), S. 260–266. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.04.003.

Burnett, G.; Kennedy, E. P. (1954): The enzymatic phosphorylation of proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 211 (2), S. 969–980.

Christofk, Heather R.; Wu, Ning; Cantley, Lewis C.; Asara, John M. (2011): Proteomic screening method for phosphopeptide motif binding proteins using peptide libraries. In: *Journal of proteome research* 10 (9), S. 4158–4164. DOI: 10.1021/pr200578n.

Clough, Steven J.; Bent, Andrew F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 16. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.

Cohen, Philip; Knebel, Axel (2006): KESTREL. A powerful method for identifying the physiological substrates of protein kinases. In: *The Biochemical journal* 393 (Pt 1), S. 1–6. DOI: 10.1042/BJ20051545.

Dardick, Christopher; Chen, Johann; Richter, Todd; Ouyang, Shu; Ronald, Pamela (2007): The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. In: *Plant physiology* 143 (2), S. 579–586. DOI: 10.1104/pp.106.087270.

Engelmann, Th. W. (1882): Ueber Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Mikrospektrum. In: *Pflüger, Arch.* 27 (1), S. 485–489. DOI: 10.1007/BF01802976.

Espunya, M. C.; Combettes, B.; Dot, J.; Chaubet-Gigot, N.; Martínez, M. C. (1999): Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19 (6), S. 655–666.

Espunya, M. Carme; López-Giráldez, Trinitat; Hernan, Immaculada; Carballo, Miguel; Martínez, M. Carmen (2005): Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. In: *Journal of experimental botany* 56 (422), S. 3183–3192. DOI: 10.1093/jxb/eri315.

Eugeni Piller, Lucia; Abraham, Marion; Dörmann, Peter; Kessler, Felix; Besagni, Céline (2012): Plastid lipid droplets at the crossroads of prenylquinone metabolism. In: *Journal of experimental botany* 63 (4), S. 1609–1618. DOI: 10.1093/jxb/ers016.

Feilner, Tanja; Hultschig, Claus; Lee, Justin; Meyer, Svenja; Immink, Richard G. H.; Koenig, Andrea et al. (2005): High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4 (10), S. 1558–1568. DOI: 10.1074/mcp.M500007-MCP200.

Fitzpatrick, Lynda M.; Keegstra, Kenneth (2001): A method for isolating a high yield of *Arabidopsis* chloroplasts capable of efficient import of precursor proteins. In: *The Plant Journal* 27 (1), S. 59–65. DOI: 10.1046/j.0960-7412.2001.01061.x.

Guo, C.; Yu, S.; Davis, A. T.; Wang, H.; Green, J. E.; Ahmed, K. (2001): A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-

- induced apoptosis in cancer cells. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (8), S. 5992–5999. DOI: 10.1074/jbc.M004862200.
- Helm, Stefan; Baginsky, Sacha (2018): MSE for Label-Free Absolute Protein Quantification in Complex Proteomes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1696, S. 235–247. DOI: 10.1007/978-1-4939-7411-5\_16.
- Hertz, Nicholas T.; Wang, Beatrice T.; Allen, Jasmina J.; Zhang, Chao; Dar, Arvin C.; Burlingame, Alma L.; Shokat, Kevan M. (2010): Chemical genetic approach for kinase-substrate mapping by covalent capture of thiophosphopeptides and analysis by mass spectrometry. In: *Current protocols in chemical biology* 2 (1), S. 15–36. DOI: 10.1002/9780470559277.ch090201.
- Hidalgo, P.; Garretón, V.; Berríos, C. G.; Ojeda, H.; Jordana, X.; Holuigue, L. (2001): A nuclear casein kinase 2 activity is involved in early events of transcriptional activation induced by salicylic acid in tobacco. In: *Plant physiology* 125 (1), S. 396–405.
- Hirsch, S.; Muckel, E.; Heemeyer, F.; Heijne, G. von; Soll, J. (1994): A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. In: *Science (New York, N.Y.)* 266 (5193), S. 1989–1992. DOI: 10.1126/science.7801125.
- Ho, C. L.; Noji, M.; Saito, M.; Saito, K. (1999): Regulation of serine biosynthesis in Arabidopsis. Crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (1), S. 397–402.
- Hornbeck, Peter V.; Chabra, Indy; Kornhauser, Jon M.; Skrzypek, Elzbieta; Zhang, Bin (2004): PhosphoSite. A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. In: *Proteomics* 4 (6), S. 1551–1561. DOI: 10.1002/pmic.200300772.
- Huang, Hsien-Da; Lee, Tzong-Yi; Tzeng, Shih-Wei; Horng, Jorng-Tzong (2005): KinasePhos. A web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. In: *Nucleic acids research* 33 (Web Server issue), W226-9. DOI: 10.1093/nar/gki471.
- Huang, Yadong; Houston, Norma L.; Tovar-Mendez, Alejandro; Stevenson, Severin E.; Miernyk, Jan A.; Randall, Douglas D.; Thelen, Jay J. (2010): A quantitative mass spectrometry-based approach for identifying protein kinase clients and quantifying kinase activity. In: *Analytical biochemistry* 402 (1), S. 69–76. DOI: 10.1016/j.ab.2010.03.028.
- Hunter, T. (1995): Protein kinases and phosphatases. The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. In: *Cell* 80 (2), S. 225–236.
- Ivanova, Yordanka; Smith, Matthew D.; Chen, Kunhua; Schnell, Danny J. (2004): Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. In: *Molecular biology of the cell* 15 (7), S. 3379–3392. DOI: 10.1091/mbc.E03-12-0923.
- Johnson, Matthew P. (2018): Metabolic regulation of photosynthetic membrane structure tunes electron transfer function. In: *The Biochemical journal* 475 (7), S. 1225–1233. DOI: 10.1042/BCJ20170526.
- Kanekatsu, M.; Munakata, H.; Furuzono, K.; Ohtsuki, K. (1993): Biochemical characterization of a 34 kDa ribonucleoprotein (p34) purified from the spinach chloroplast fraction as an effective phosphate acceptor for casein kinase II. In: *FEBS Letters* 335 (2), S. 176–180.

- Kanekatsu, M.; Saito, H.; Motohashi, K.; Hisabori, T. (1998): The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF0CF1-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II. In: *Biochemistry and molecular biology international* 46 (1), S. 99–105.
- Kato, K.; Kidou, S.; Miura, H.; Sawada, S. (2002): Molecular cloning of the wheat CK2alpha gene and detection of its linkage with Vrn-A1 on chromosome 5A. In: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 104 (6-7), S. 1071–1077. DOI: 10.1007/s00122-001-0805-0.
- Kiba, Takatoshi; Aoki, Koh; Sakakibara, Hitoshi; Mizuno, Takeshi (2004): Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. In: *Plant & cell physiology* 45 (8), S. 1063–1077. DOI: 10.1093/pcp/pch128.
- Kim, Sang Y.; Bender, Kyle W.; Walker, Berkley J.; Zielinski, Raymond E.; Spalding, Martin H.; Ort, Donald R.; Huber, Steven C. (2016): The Plastid Casein Kinase 2 Phosphorylates Rubisco Activase at the Thr-78 Site but Is Not Essential for Regulation of Rubisco Activation State. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 404. DOI: 10.3389/fpls.2016.00404.
- Kleffmann, Torsten; Zychlinski, Anne von; Russenberger, Doris; Hirsch-Hoffmann, Matthias; Gehrig, Peter; Gruissem, Wilhelm; Baginsky, Sacha (2007): Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. In: *Plant physiology* 143 (2), S. 912–923. DOI: 10.1104/pp.106.090738.
- Kubis, Sybille E.; Lilley, Kathryn S.; Jarvis, Paul (2008): Isolation and preparation of chloroplasts from Arabidopsis thaliana plants. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 425, S. 171–186. DOI: 10.1007/978-1-60327-210-0\_16.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lee, Y.; Lloyd, A. M.; Roux, S. J. (1999): Antisense expression of the CK2 alpha-subunit gene in Arabidopsis. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. In: *Plant physiology* 119 (3), S. 989–1000.
- Lennartsson, T.; Tuomi, J.; Nilsson, P. (1997): Evidence for an evolutionary history of overcompensation in the grassland biennial *Gentianella campestris* (Gentianaceae). In: *The American naturalist* 149 (6), S. 1147–1155. DOI: 10.1086/286043.
- Li, Xiang; Guan, Bin; Srivastava, Minu K.; Padmanabhan, Achuth; Hampton, Brian S.; Bieberich, Charles J. (2007): The reverse in-gel kinase assay to profile physiological kinase substrates. In: *Nature methods* 4 (11), S. 957–962. DOI: 10.1038/nmeth1106.
- Liebler, Daniel C.; Zimmerman, Lisa J. (2013): Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. In: *Biochemistry* 52 (22), S. 3797–3806. DOI: 10.1021/bi400110b.
- Link, Gerhard (2003): Redox regulation of chloroplast transcription. In: *Antioxidants & redox signaling* 5 (1), S. 79–87. DOI: 10.1089/152308603321223568.
- Litchfield, David W. (2003): Protein kinase CK2. Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. In: *The Biochemical journal* 369 (Pt 1), S. 1–15. DOI: 10.1042/BJ20021469.
- Liu, Weihong; Saint, David A. (2002): Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294 (2), S. 347–353. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00478-3.



- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- López-Calcano, Patricia E.; Howard, Thomas P.; Raines, Christine A. (2014): The CP12 protein family. A thioredoxin-mediated metabolic switch? In: *Frontiers in plant science* 5, S. 9. DOI: 10.3389/fpls.2014.00009.
- Loza-Tavera, H.; Vargas-Suárez, M.; Díaz-Mireles, E.; Torres-Márquez, M. E.; La González de Vara, L. E.; Moreno-Sánchez, R.; Gruissem, W. (2006): Phosphorylation of the spinach chloroplast 24 kDa RNA-binding protein (24RNP) increases its binding to petD and psbA 3' untranslated regions. In: *Biochimie* 88 (9), S. 1217–1228. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.03.009.
- Lu, Qintao; Helm, Stefan; Rödiger, Anja; Baginsky, Sacha (2015): On the Extent of Tyrosine Phosphorylation in Chloroplasts. In: *Plant physiology* 169 (2), S. 996–1000. DOI: 10.1104/pp.15.00921.
- Lung, Shiu-Cheung; Chuong, Simon D. X. (2012): A transit peptide-like sorting signal at the C terminus directs the *Bienertia sinuspersici* preprotein receptor Toc159 to the chloroplast outer membrane. In: *The Plant cell* 24 (4), S. 1560–1578. DOI: 10.1105/tpc.112.096248.
- Manning, Brendan D.; Cantley, Lewis C. (2002): Hitting the target. Emerging technologies in the search for kinase substrates. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2002 (162), pe49. DOI: 10.1126/stke.2002.162.pe49.
- Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. (2002): The protein kinase complement of the human genome. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5600), S. 1912–1934. DOI: 10.1126/science.1075762.
- Meggio, Flavio; Pinna, Lorenzo A. (2003): One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (3), S. 349–368. DOI: 10.1096/fj.02-0473rev.
- Michael Walter Pfaffl (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. In: *Biospektrum* 10 (1), S. 92–96.
- Mullis, Kary B.; Faloona, Fred A. (1987): [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in Enzymology : Recombinant DNA Part F, Volume 155*: Academic Press, S. 335–350.
- Murphy, D. J.; Walker, D. A. (1982): The properties of transketolase from photosynthetic tissue. In: *Planta* 155 (4), S. 316–320. DOI: 10.1007/BF00429458.
- Nikonorova, Natalia; Vu, Lam Dai; Stes, Elisabeth; Gevaert, Kris; Smet, Ive de (2018): Proteome Analysis of Arabidopsis Roots. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1761, S. 263–274. DOI: 10.1007/978-1-4939-7747-5\_20.
- Ogrzewalla, Karsten; Piotrowski, Markus; Reinbothe, Steffen; Link, Gerhard (2002): The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. In: *European journal of biochemistry* 269 (13), S. 3329–3337.
- Ong, Shao-En; Blagoev, Blagoy; Kratchmarova, Irina; Kristensen, Dan Bach; Steen, Hanno; Pandey, Akhilesh; Mann, Matthias (2002): Stable isotope labeling by amino

- acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1 (5), S. 376–386.
- Overvoorde, Paul; Fukaki, Hidehiro; Beeckman, Tom (2010): Auxin control of root development. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (6), a001537. DOI: 10.1101/cshperspect.a001537.
- Padmanabha, R.; Chen-Wu, J. L.; Hanna, D. E.; Glover, C. V. (1990): Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene. Casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and cellular biology* 10 (8), S. 4089–4099.
- Paige, Ken N.; Whitham, Thomas G. (1987): Flexible Life History Traits. Shifts by Scarlet Gilia in Response to Pollinator Abundance. In: *Ecology* 68 (6), S. 1691–1695. DOI: 10.2307/1939861.
- Pesaresi, Paolo; Hertle, Alexander; Pribil, Mathias; Kleine, Tatjana; Wagner, Raik; Strissel, Henning et al. (2009): Arabidopsis STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. In: *The Plant cell* 21 (8), S. 2402–2423. DOI: 10.1105/tpc.108.064964.
- Pfannschmidt, Thomas (2003): Chloroplast redox signals. How photosynthesis controls its own genes. In: *Trends in plant science* 8 (1), S. 33–41.
- Pimienta, Genaro; Chaerkady, Raghothama; Pandey, Akhilesh (2009): SILAC for global phosphoproteomic analysis. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 527, 107–16, x. DOI: 10.1007/978-1-60327-834-8\_9.
- Pinna, Lorenzo A. (1997): Protein kinase CK2. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (4), S. 551–554. DOI: 10.1016/S1357-2725(96)00142-2.
- Pinna, Lorenzo A. (2002): Protein kinase CK2. A challenge to canons. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 20), S. 3873–3878.
- Popescu, Sorina C.; Popescu, George V.; Snyder, Michael; Dinesh-Kumar, Savithramma P. (2009): Integrated analysis of co-expressed MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Signaling & Behavior* 4 (6), S. 524–527.
- Reiland, Sonja; Messerli, Gaëlle; Baerenfaller, Katja; Gerrits, Bertran; Endler, Anne; Grossmann, Jonas et al. (2009): Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. In: *Plant Physiol.* 150 (2), S. 889–903. DOI: 10.1104/pp.109.138677.
- Richardson, Lynn G. L.; Paila, Yamuna D.; Siman, Steven R.; Chen, Yi; Smith, Matthew D.; Schnell, Danny J. (2014): Targeting and assembly of components of the TOC protein import complex at the chloroplast outer envelope membrane. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 269. DOI: 10.3389/fpls.2014.00269.
- Riera, M.; Peracchia, G.; Nadal, E. de; Ariño, J.; Pagès, M. (2001): Maize protein kinase CK2. Regulation and functionality of three beta regulatory subunits. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25 (4), S. 365–374.
- Rigaut, G.; Shevchenko, A.; Rutz, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Séraphin, B. (1999): A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. In: *Nature biotechnology* 17 (10), S. 1030–1032. DOI: 10.1038/13732.

- Rochaix, Jean-David; Lemeille, Sylvain; Shapiguzov, Alexey; Samol, Iga; Fucile, Geoffrey; Willig, Adrian; Goldschmidt-Clermont, Michel (2012): Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367 (1608), S. 3466–3474. DOI: 10.1098/rstb.2012.0064.
- Rodnight, R.; FLavin, B. E.; Lavin, B. E. (1964): Phosvitin kinase from brain: activation by ions and subcellular distribution. In: *The Biochemical journal* 93 (1), S. 84–91.
- Ros, Roc; Muñoz-Bertomeu, Jesús; Krueger, Stephan (2014): Serine in plants. Biosynthesis, metabolism, and functions. In: *Trends in plant science* 19 (9), S. 564–569. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.06.003.
- Salinas, P.; Bantignies, B.; Tapia, J.; Jordana, X.; Holuigue, L. (2001): Cloning and characterization of the cDNA coding for the catalytic alpha subunit of CK2 from tobacco. In: *Molecular and cellular biochemistry* 227 (1-2), S. 129–135.
- Salinas, Paula; Fuentes, Daniela; Vidal, Elena; Jordana, Xavier; Echeverria, Manuel; Holuigue, Loreto (2006): An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in Arabidopsis: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. In: *Plant & cell physiology* 47 (9), S. 1295–1308. DOI: 10.1093/pcp/pcj100.
- Salvucci, M. E.; Portis, A. R.; Ogren, W. L. (1986): Light and CO<sub>2</sub> Response of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activation in Arabidopsis Leaves. In: *Plant physiology* 80 (3), S. 655–659.
- Schmitz-Linneweber, Christian; Small, Ian (2008): Pentatricopeptide repeat proteins. A socket set for organelle gene expression. In: *Trends in plant science* 13 (12), S. 663–670. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.001.
- Schonberg, Anna; Bergner, Elena; Helm, Stefan; Agne, Birgit; Dunschede, Beatrix; Schunemann, Danja et al. (2014): The peptide microarray "ChloroPhos1.0" identifies new phosphorylation targets of plastid casein kinase II (pCKII) in Arabidopsis thaliana. In: *PloS one* 9 (10), e108344. DOI: 10.1371/journal.pone.0108344.
- Shah, K.; Liu, Y.; Deirmengian, C.; Shokat, K. M. (1997): Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8), S. 3565–3570.
- Shah, Kavita; Shokat, Kevan M. (2003): A chemical genetic approach for the identification of direct substrates of protein kinases. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 233, S. 253–271. DOI: 10.1385/1-59259-397-6:253.
- Sharwood, Robert E.; Halpert, Michal; Luro, Scott; Schuster, Gadi; Stern, David B. (2011): Chloroplast RNase J compensates for inefficient transcription termination by removal of antisense RNA. In: *RNA (New York, N.Y.)* 17 (12), S. 2165–2176. DOI: 10.1261/rna.028043.111.
- Siddappaji, Madhura H.; Scholes, Daniel R.; Bohn, Martin; Paige, Ken N. (2013): Overcompensation in response to herbivory in Arabidopsis thaliana. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and the oxidative pentose-phosphate pathway. In: *Genetics* 195 (2), S. 589–598. DOI: 10.1534/genetics.113.154351.

- Singh, Dharmendra K.; McNellis, Timothy W. (2011): Fibrillin protein function. The tip of the iceberg? In: *Trends in plant science* 16 (8), S. 432–441. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.03.014.
- Songyang, Z.; Blechner, S.; Hoagland, N.; Hoekstra, M. F.; Piwnica-Worms, H.; Cantley, L. C. (1994): Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. In: *Current biology : CB* 4 (11), S. 973–982.
- Stowe, Kirk A.; Marquis, Robert J.; Hochwender, Cris G.; Simms, Ellen L. (2000): The Evolutionary Ecology of Tolerance to Consumer Damage. In: *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31 (1), S. 565–595. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.31.1.565.
- Sugano, S.; Andronis, C.; Green, R. M.; Wang, Z. Y.; Tobin, E. M. (1998): Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (18), S. 11020–11025.
- Sugano, S.; Andronis, C.; Ong, M. S.; Green, R. M.; Tobin, E. M. (1999): The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (22), S. 12362–12366.
- Szeczowka, Marek; Heise, Robert; Tohge, Takayuki; Nunes-Nesi, Adriano; Vosloh, Daniel; Huege, Jan et al. (2013): Metabolic fluxes in an illuminated Arabidopsis rosette. In: *The Plant cell* 25 (2), S. 694–714. DOI: 10.1105/tpc.112.106989.
- Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo; Møller, Ian Max; Murphy, Angus (2015): Plant physiology and development. Sixth Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc.
- Thiele, Alexandra; Weiwad, Matthias; Zerweck, Johannes; Fischer, Gunter; Schutkowski, Mike (2010): High density peptide microarrays for proteome-wide fingerprinting of kinase activities in cell lysates. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 669, S. 173–181. DOI: 10.1007/978-1-60761-845-4\_14.
- van Wijk, Klaas J.; Friso, Giulia; Walther, Dirk; Schulze, Waltraud X. (2014): Meta-Analysis of Arabidopsis thaliana Phospho-Proteomics Data Reveals Compartmentalization of Phosphorylation Motifs. In: *The Plant cell* 26 (6), S. 2367–2389. DOI: 10.1105/tpc.114.125815.
- Vanneste, Steffen; Friml, Jirí (2009): Auxin. A trigger for change in plant development. In: *Cell* 136 (6), S. 1005–1016. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.001.
- Venkatesha, Shivaprasad H. (2016): Methods to Profile Protein Kinase Substrates in Cells. In: *MOJPB* 4 (4). DOI: 10.15406/mojpb.2016.04.00126.
- Vilk, Greg; Weber, Jane E.; Turowec, Jacob P.; Duncan, James S.; Wu, Chenggang; Derksen, D. Richard et al. (2008): Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. In: *Cellular signalling* 20 (11), S. 1942–1951. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.07.002.
- Wang, Yu; Chang, Hongping; Hu, Shuai; Lu, Xiutao; Yuan, Congying; Zhang, Chen et al. (2014): Plastid casein kinase 2 knockout reduces abscisic acid (ABA) sensitivity, thermotolerance, and expression of ABA- and heat-stress-responsive nuclear genes. In: *Journal of experimental botany* 65 (15), S. 4159–4175. DOI: 10.1093/jxb/eru190.
- Wedel, N.; Soll, J.; Paap, B. K. (1997): CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19), S. 10479–10484.

- Willig, Adrian; Shapiguzov, Alexey; Goldschmidt-Clermont, Michel; Rochaix, Jean-David (2011): The phosphorylation status of the chloroplast protein kinase STN7 of *Arabidopsis* affects its turnover. In: *Plant physiology* 157 (4), S. 2102–2107. DOI: 10.1104/pp.111.187328.
- Wirkner, U.; Voss, H.; Ansorge, W.; Pyerin, W. (1998): Genomic organization and promoter identification of the human protein kinase CK2 catalytic subunit alpha (CSNK2A1). In: *Genomics* 48 (1), S. 71–78. DOI: 10.1006/geno.1997.5136.
- Wirkner, U.; Voss, H.; Lichter, P.; Pyerin, W. (1994): Human protein kinase CK2 genes. In: *Cellular & molecular biology research* 40 (5-6), S. 489–499.
- Woodward, Andrew W.; Bartel, Bonnie (2005): Auxin. Regulation, action, and interaction. In: *Annals of botany* 95 (5), S. 707–735. DOI: 10.1093/aob/mci083.
- Xue, Yu; Gao, Xinjiao; Cao, Jun; Liu, Zexian; Jin, Changjiang; Wen, Longping et al. (2010): A summary of computational resources for protein phosphorylation. In: *Current protein & peptide science* 11 (6), S. 485–496.
- Xue, Yu; Ren, Jian; Gao, Xinjiao; Jin, Changjiang; Wen, Longping; Yao, Xuebiao (2008): GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7 (9), S. 1598–1608. DOI: 10.1074/mcp.M700574-MCP200.
- Zulawski, Monika; Schulze, Gunnar; Braginets, Rostyslav; Hartmann, Stefanie; Schulze, Waltraud X. (2014): The *Arabidopsis* Kinome. Phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. In: *BMC genomics* 15, S. 548. DOI: 10.1186/1471-2164-15-548.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Elena Bergner

Adresse: Schleusenstraße 11  
06231 Bad Dürrenberg

E-Mail: elena\_bergner@gmx.de

Geburtstag: 06.06.1984

Geburtsort: Gomel (Weißrussland)

Familienstand: 3 Kinder (8,5,4)

### Ausbildung und bisherige Karriere

04/2017- ... Mitarbeiter an der MLU Abt. Ertragsphysiologie

06/2010-03/2017 wiss. Mitarbeiter an der MLU Abt. Pflanzenbiochemie

11/2009-03/2010 wiss. Mitarbeiter an der MLU Abt. Enzymologie

10/2004-10/2009 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU)

Fachrichtung: **Biochemie**

Abschluss: Diplom, Note: 1,7

### Schulbildung

2000-2004 Besuch des Lucas-Cranach-Gymnasiums in  
Lutherstadt Wittenberg

Abschluss: Abitur (Note 1,8)

1991-2000 Besuch der Gesamtschule Nr. 18 in Kazan, Russland

1990-1997 Besuch der Musikschule Nr 1. in Kazan, Russland

Hauptfach Klavier

Abschluss: Befähigung zum Musikstudium (Note 2,0)

### Sonstige Qualifikationen

Sprachen: Russisch fließend in Wort und Schrift, Englisch

PC-Kenntnisse: MS-Office Standardprogramme

Zertifizierter Imker

### Hobbys

Klavierspielen, Imkern

## Danksagung

Mein Größter Dank gilt Prof. Sacha Baginsky, für die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe die Arbeit anfertigen zu können und für die erbrachte Geduld aufgrund vieler Rückschläge während der Anfertigung der Arbeit.

Dr. Dr. Gerd Hause für die elektronenmikroskopische Aufnahmen.

Dr. Anja Rödiger, die mir half mich zu ordnen.

Dr. Dirk Dobritzsch, der sehr viele Massenspektrometrieproben gemessen und bei der Auswertung geholfen hatte.

Dr. Julia Grimmer, die mich in vielen Tiefs auffing und aufbaute.

Dr. Jana Heise, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Und natürlich dem Rest der AG: Dr. Daniel Köhler, Julia Frank, Dr. Anna Schönberg, Dr. Birgit Agne und Martina Steinberg für ein sehr schönes und fast familiäres Arbeitsklima.

Und natürlich meiner Mutter und meiner Schwester, für all die Liebe und Unterstützung in jeder Lebenssituation.