



Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Naturwissenschaftliche Fakultät I (Biowissenschaften)  
Institut für Biochemie und Biotechnologie

**Zwischen Plasmamembran und Zytoskelett – Interaktion pflanzlicher  
PI4P 5-Kinasen mit Myosinen der Klasse VIII**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
“doctor rerum naturalium”

Vorgelegt von Christoph Kastner

geboren am 30.10.1993 in Sangerhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ingo Heilmann  
2. PD Dr. Hauke Lilie  
3. Prof. Dr. Ralph Hückelhoven

Eingereicht am: 14.03.2023

Verteidigt am: 13.10.2023

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Die Membran als wichtige Einheit des Lebens .....	1
1.1.1 Membranen als hydrophobe Grenze .....	1
1.1.2 Membranen als funktionelle Einheit .....	2
1.2 Strukturlipide und Signallipide.....	3
1.3 Die Phosphoinositid-Biosynthese in Pflanzen.....	6
1.4 Aufbau und Funktion der PI4P 5-Kinasen .....	8
1.5 Myosine: Eine diverse und komplexe Superfamilie von Proteinen .....	12
1.6 Die pflanzlichen Myosine.....	14
1.6.1 Pflanzliche Myosine der Klasse XI.....	15
1.6.2 Pflanzliche Myosine der Klasse VIII .....	16
1.7 Zielstellung .....	18
2 Material .....	20
2.1 Medien .....	20
2.2 Verwendete Antibiotika.....	21
2.3 Puffer und Lösungen .....	21
2.4 Phospholipide .....	22
2.5 Enzyme und Antikörper.....	22
2.6 Kitsysteme .....	23
2.7 Mikroorganismen.....	23
2.8 Vektoren .....	23
2.9 Geräte.....	25
2.10 Software.....	25
3 Methoden.....	26
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
3.1.1 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA aus Arabidopsis.....	26
3.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	26
3.1.3 Restriktion von DNA .....	27
3.1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese .....	27

3.1.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	28
3.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
3.1.7	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Kulturen .....	28
3.1.8	Klonierungsstrategie zur Herstellung von Fusionskonstrukten .....	29
3.1.9	Sequenzierung .....	29
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	30
3.2.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
3.2.2	Hitzeschock-vermittelte Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	30
3.2.3	Herstellung und Transformation chemokompetenter <i>S. cerevisiae</i> .....	31
3.2.4	Erzeugung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	32
3.3	Proteinanreicherung.....	33
3.3.1	Zellaufschluss zur nativen Proteinisolierung .....	33
3.3.2	Isolation und Solubilisierung von Einschlusskörpern .....	34
3.3.3	Affinitätschromatographie zur Anreicherung von Proteinen .....	35
3.3.4	Trennung von Proteinen nach ihrer Größe durch Größenausschlusschromatographie (SEC).....	36
3.3.5	Renaturierungsstrategien zur Rückfaltung fehlgefalteter Proteine .....	37
3.3.6	Umpuffern mittels Dialyse .....	39
3.3.7	Proteinfällung mittels NaDoc/TCA.....	40
3.4	Proteinanalytik.....	40
3.4.1	Trennung von Proteingemischen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE) .....	40
3.4.2	Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und Immundetektion . .....	42
3.4.3	Bestimmung von Oligomerisierungsgraden von Proteinen durch analytische Ultrazentrifugation .....	43
3.4.4	Strukturanalyse mittels Circular dichroismus-Spektroskopie .....	44
3.4.5	Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie.....	45
3.5	Konzentrationsbestimmungen verschiedener Biomoleküle .....	46
3.5.1	UV/VIS-Absorptionsspektroskopie .....	46
3.5.2	Konzentrationsbestimmung mittels Bradford .....	47
3.6	Methoden zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen.....	48
3.6.1	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion .....	48
3.6.2	Untersuchung der Lipid-Protein-Interaktion .....	50
3.6.3	Bestimmung der PI4P 5-Kinase-Aktivität.....	51

4	Ergebnisse .....	54
4.1	Kapitel I: Biochemische Charakterisierung von PI4P 5-Kinasen .....	54
4.1.1	Native Reinigungsstrategien von PIP5K2 und PIP5K6 .....	54
4.1.2	Rekombinant exprimierte PI4P 5-Kinasen sind trotz ihrer aggregierten Form enzymatisch aktiv .....	58
4.1.3	Denaturierung und Renaturierung von PIP5K2 und PIP5K6.....	60
4.2	Kapitel II: Interaktion von PI4P 5-Kinasen mit Myosinen der Klasse VIII.....	65
4.2.1	Interaktionsstudien von PIP5K2 und PIP5K6 mit verschiedenen Myosinen aus <i>A. thaliana</i> .....	66
4.2.2	Native Anreicherung des C-Terminus von Myosin ATM1 .....	70
4.2.3	Denaturierende Anreicherung und Renaturierung der C-Termini der Myosine ATM2 und VIII-B .....	73
4.2.4	Interaktionstest via <i>pull-down</i> .....	77
4.2.5	Myosine der Klasse VIII binden anionische Phospholipide .....	78
4.2.6	ATM2 und VIII-B modulieren die enzymatische Aktivität von PI4P 5-Kinasen <i>in vitro</i> .....	84
5	Diskussion .....	87
5.1	Native Anreicherung pflanzlicher PI4P 5-Kinasen .....	87
5.2	Renaturierungsstrategien pflanzlicher PI4P 5-Kinasen.....	89
5.3	Interaktion zwischen Myosinen der Klasse VIII und PI4P 5-Kinasen.....	91
5.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung von Myosin ATM1, ATM2 und VIII-B.....	94
5.5	Lipidbindung der Myosine der Klasse VIII.....	95
5.6	Myosine der Klasse VIII als Modulatoren der enzymatischen Aktivität pflanzlicher PI4P 5-Kinasen in der Aktinregulation .....	98
6	Zusammenfassung.....	102
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Anhang .....	116
	Danksagung.....	124
	Lebenslauf.....	126
	Erklärung.....	127

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ad	aufgefüllt auf (lat. „zu“)
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATM	<i>Arabidopsis thaliana</i> Myosin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorption Unit</i>
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BFM	Biofeuchtmasse
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serumalbumin)
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cv	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i> (zweifach destilliertes Wasser)
deg	<i>degree</i> (Grad)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DMF	Dimethylformamin
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DO	Di-Oleoylreste (an Glycerolipiden)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et aliae</i> (lat. „und andere“)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GSH	Glutathion, reduziert
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub> -Tag	Hexa-Histidin-Markierung
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IB	<i>inclusion body</i> (Einschlusskörper)
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
LiOAc	Lithiumacetat
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)

MLU	Martin-Luther-Universität
MRW	<i>mean residue weight</i>
MS	<i>mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (Größenausschluss-Limit)
NaDoc	Natriumdeoxycholat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PA	Phosphatidylsäure
PC	Phosphatidylcholin
PI	Phosphatidylinositol
PI4P	Phosphatidylinositol- 4-Phosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol- 4,5-Bisphosphat
PS	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
rel.	relativ
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatografie)
T4	Escherichia-Virus T4
T7	Escherichia-Virus T7
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline</i> mit Tween 20
TE	Tris-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	<i>units</i> (Einheiten)
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
VIS	<i>visible</i> (sichtbar)
w/v	<i>weight per volume</i> (Massenprozent)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionen biologischer Membranen am Beispiel einer Pflanzenzelle. ....	3
Abbildung 2: Allgemeiner Aufbau von Phospholipiden und Struktur verschiedener Lipidklassen. ....	4
Abbildung 3: Synthese und Abbau pflanzlicher Phosphoinositide. ....	7
Abbildung 4: Domänenstruktur von PI4P 5-Kinasen aus <i>A. thaliana</i> . ....	8
Abbildung 5: Tertiärstruktur der menschlichen PIPKII $\beta$ . ....	10
Abbildung 6: Kristallstruktur des MORN4/Myo3a-Komplexes. ....	12
Abbildung 7: Allgemeine Struktur der pflanzlichen Myosine der Klassen VIII und XI. ....	15
Abbildung 8: Phylogramm der Myosine der Klasse VIII aus <i>A. thaliana</i> . ....	17
Abbildung 9: Analyse verschiedener Proben der PIP5K2-Anreicherung. ....	55
Abbildung 10: SDS-PAGE-Gele aus der Anreicherung von MBP-PIP5K6 und Analyse mithilfe der AUZ. ....	57
Abbildung 11: Dünnschichtchromatographie der Aktivitätstests von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6. ....	59
Abbildung 12: Renaturierung von PIP5K2 und PIP5K6 mittels Dialyse. ....	62
Abbildung 13: Renaturierung von His <sub>6</sub> -SUMO-PIP5K2 auf einer Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix. ....	64
Abbildung 14: Hefe-Zwei-Hybrid-Studien von PIP5K2 und PIP5K6 als Köder mit diversen Myosinen aus <i>A. thaliana</i> als Beute. ....	67
Abbildung 15: Hefe-Zwei-Hybrid-Studien mit trunkierten Varianten von PIP5K2 mit C-Termini ausgewählter Myosine. ....	68
Abbildung 16: Allgemeine Struktur der Klasse VIII-Myosine und verwendete Fragmente. ..	70
Abbildung 17: SDS-PAGE-Gele (15 % Acrylamid) von His <sub>6</sub> -ATM1 <sub>941-1166</sub> -Produktion in <i>E. coli</i> und Löslichkeits-Analysen. ....	71
Abbildung 18: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von His <sub>6</sub> -ATM1 <sub>941-1166</sub> und Analyse mithilfe einer SDS-PAGE. ....	72
Abbildung 19: Denaturierende Anreicherung und Renaturierung der C-terminalen Fragmente von Myosin ATM2 und VIII-B. ....	74
Abbildung 20: Absorptionsspektren und CD-Spektren von renaturierten Myosinen His <sub>6</sub> -ATM2 <sub>972-1220</sub> und His <sub>6</sub> -VIII-B <sub>921-1134</sub> . ....	76
Abbildung 21: Western blots vom Interaktionstest von His <sub>6</sub> -ATM2 <sub>972-1220</sub> mit MBP-PIP5K2, MBP-PIP5K6 und MBP via Pull-down. ....	77
Abbildung 22: BH-Plot-Analyse von den Myosinen der Klasse VIII aus <i>A. thaliana</i> . ....	80

Abbildung 23: Lipid-Bindungsstudien der C-terminalen Fragmente der Myosine der Klasse VIII.....	81
Abbildung 24: Lipidbindungsstudien der renaturierten C-terminalen Fragmente von Myosin ATM2 und VIII-B. ....	82
Abbildung 25: Aktivitätstest von PIP5K2 und PIP5K6 mit den C-terminalen Fragmenten von Myosin ATM2 und VIII-B.....	85
Abbildung 26: Der C-terminale Bereich von ATM2 ist notwendig für die Assoziation mit der Plasmamembran. ....	96
Abbildung 27: Modell zur selbstamplifizierenden Schleife von Myosinen der Klasse VIII an die Plasmamembran. ....	99
Abbildung 28: Chromatogramme der Anreicherungen von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6. ....	119
Abbildung 29: Größenausschlusschromatographien der verkürzten Varianten von MBP-PIP5K2 $\Delta$ Lin und MBP-PIP5K6 $\Delta$ Lin ohne Linker- und MORN-Domäne.....	120
Abbildung 30: Hefe-Zwei-Hybrid-Studien von diversen PI4P 5-Kinasen mit ausgewählten Myosinen aus <i>A. thaliana</i> . ....	120
Abbildung 31: Hefe-Zwei-Hybrid-Test von PIP5K2 mit Myosinvarianten aus <i>A. thaliana</i> . ....	121
Abbildung 32: SDS-Gele (15 % Acrylamid) von Löslichkeits-Analysen des ATM1-Proteins. ....	121
Abbildung 33: Native Anreicherung von ATM1 mithilfe einer Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix.....	122
Abbildung 34: SDS-Gele von renaturiertem und dialysiertem His <sub>6</sub> -ATM2 <sub>972-1220</sub> .....	122
Abbildung 35: BH-Plot-Analyse des C-Terminus von Myosin XI-1.....	123

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Medien .....	20
Tabelle 2: Verwendete Antibiotika .....	21
Tabelle 3: Verwendete Phospholipide.....	22
Tabelle 4: Verwendete Enzyme .....	22
Tabelle 5: Verwendete Antikörper.....	22
Tabelle 6: Verwendete Kitsysteme .....	23
Tabelle 7: Verwendete Mikroorganismen.....	23
Tabelle 8: Verwendete Vektoren.....	23

Tabelle 9: Verwendete Computer-Programme.....	25
Tabelle 10: Zusammensetzung der PCR-Reaktion .....	26
Tabelle 11: PCR-Programm .....	27
Tabelle 12: Expressionsbedingungen der verwendeten Konstrukte .....	32
Tabelle 13: Zusammensetzung von SDS-Gelen (für 4 x 8x10cm Gele).....	41
Tabelle 14: Verwendete Primer für Klonierung.....	116
Tabelle 15: Verwendete Primer für Sequenzierung .....	117
Tabelle 16: Verwendete Konstrukte für Genexpression in E. coli.....	118
Tabelle 17: Verwendete Konstrukte für Hefe-Zwei-Hybrid-Studien.....	118

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Membran als wichtige Einheit des Lebens

Das Leben auf unserem Planeten hat seinen Ursprung vermutlich vor etwa 4 Milliarden Jahren, im sogenannten Hadaikum, dem ersten erdgeschichtlichem Zeitalter. In dieser Zeit könnte die Abiogenese stattgefunden haben, also die Entstehung von Lebewesen aus organischen und anorganischen Stoffen. Es lässt sich nicht abschließend klären, wann genau und wo dieser Prozess erfolgte, doch wurden 3,77 Milliarden Jahre alte Fossilien gefunden, die als Überreste einzelliger Mikroorganismen interpretiert werden (Dodd et al., 2017). Zellen stellen die einfachste Einheit des Lebens dar. Sie sind durch eine Plasmamembran definiert, die sie von ihrer Umgebung abgrenzt. Diese Grenze ist essenziell notwendig, um das zelluläre Leben zu ermöglichen, wie es heute zu beobachten ist. Amphiphile Substanzen, die auf der präbiotischen Erde bereits zu finden waren, können eigenständig assemblieren und damit vesikuläre Strukturen bilden. Die Ausprägung von Hüllmembranen war ein wichtiger Schritt zum Ursprung des heutigen Lebens, und Membranen sind für jede rezente Zelle von essentieller Bedeutung (Deamer et al., 2002; Hanczyc et al., 2003).

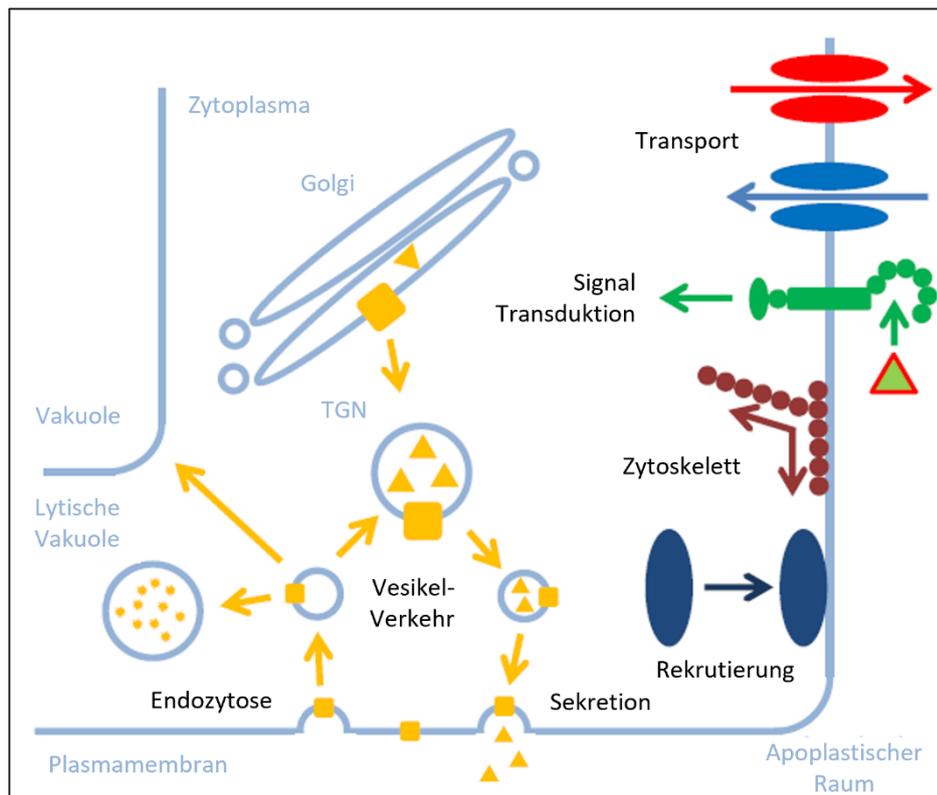
### 1.1.1 Membranen als hydrophobe Grenze

In einer Zelle finden chemische Reaktionen statt, die im Gegensatz zur Chemie der unbelebten Umwelt geordnet und gerichtet ablaufen. Um solche Stoffwechselprozesse zu ermöglichen, sind Grenzen zwischen Zellinnerem und Außenwelt in Form der Plasmamembran notwendig. Die Plasmamembran gewährleistet, dass Stoffe, die innerhalb einer Zelle gebildet werden, nicht ohne Weiteres in die Außenwelt gelangen können, oder dass Fremdstoffe aus der Umwelt nicht unkontrolliert in die Zelle dringen (Berg et al., 2013). Der Körper der Plasmamembran besteht aus Strukturlipiden. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters lagern sich diese Lipide in wässriger Umgebung zu einer Doppelschicht so zusammen, dass ihre hydrophilen Kopfgruppen einen durch die Fettsäuren gebildeten hydrophoben Bereich von der Umgebung abschirmen. So entstehen Lipid-Bilayer, die als Vesikel oder auch als planare Membranen vorliegen können und deren Struktur geeignet ist, das wässrige Milieu der Zelle von dem der Umwelt zu trennen. Im Laufe der Evolution wurden Organismen komplexer und diverse Stoffwechselreaktionen entstanden. Nach dem

Prinzip der Kompartimentierung konnten chemische Reaktionen innerhalb der Zelle räumlich voneinander getrennt werden. Diese Kompartimentierung wird ebenfalls durch die Lipid-Bilayer intrazellulärer Membranen gewährleistet und erhöht die Effizienz des Stoff- und Energiwechsels.

### **1.1.2 Membranen als funktionelle Einheit**

Aufgrund ihrer strukturellen Funktion als Grenzflächen sind Membranen essenziell für verschiedene biologische Prozesse. Während die Barrierefunktion von Membranen wichtig für ihre biologische Funktion ist, stellt sie gleichzeitig auch eine Herausforderung dar. So erfordern Membranen zum Kontakt mit der Umwelt zwingend bestimmte Strukturen, um auf eventuelle Reize, Schwankungen und Stresssituationen reagieren zu können. Dies erfolgt unter anderem durch Rezeptoren. Dabei handelt es sich um Proteine, die in der Membran verankert sind und die Aufnahme und Weitergabe von internen oder externen Signalen ermöglichen. Weiterhin gewährleisten Proteine in Form von Transportkanälen einen kontrollierten und selektiven Stoffaustausch über die Membran hinweg. Auch ein Stoffaustausch in Form von Endo- und Exozytose wird über Membranen vermittelt (Berg *et al.*, 2013). Außerdem laufen an biologischen Membranen selbst wichtige biochemische Prozesse ab. Die Membranen von Chloroplasten in Pflanzen enthalten bspw. Pigmente, die für die Photosynthese notwendig sind. Mithilfe integraler Proteine, die Elektronenflüsse ermöglichen, werden membranüberspannend Gradienten von Protonen generiert, die dann die Erzeugung von Adenosintriphosphat (ATP) ermöglichen (Deamer, 2016). Einige physiologische Prozesse, die an der Plasmamembran ablaufen, sind in Abbildung 1 gezeigt.

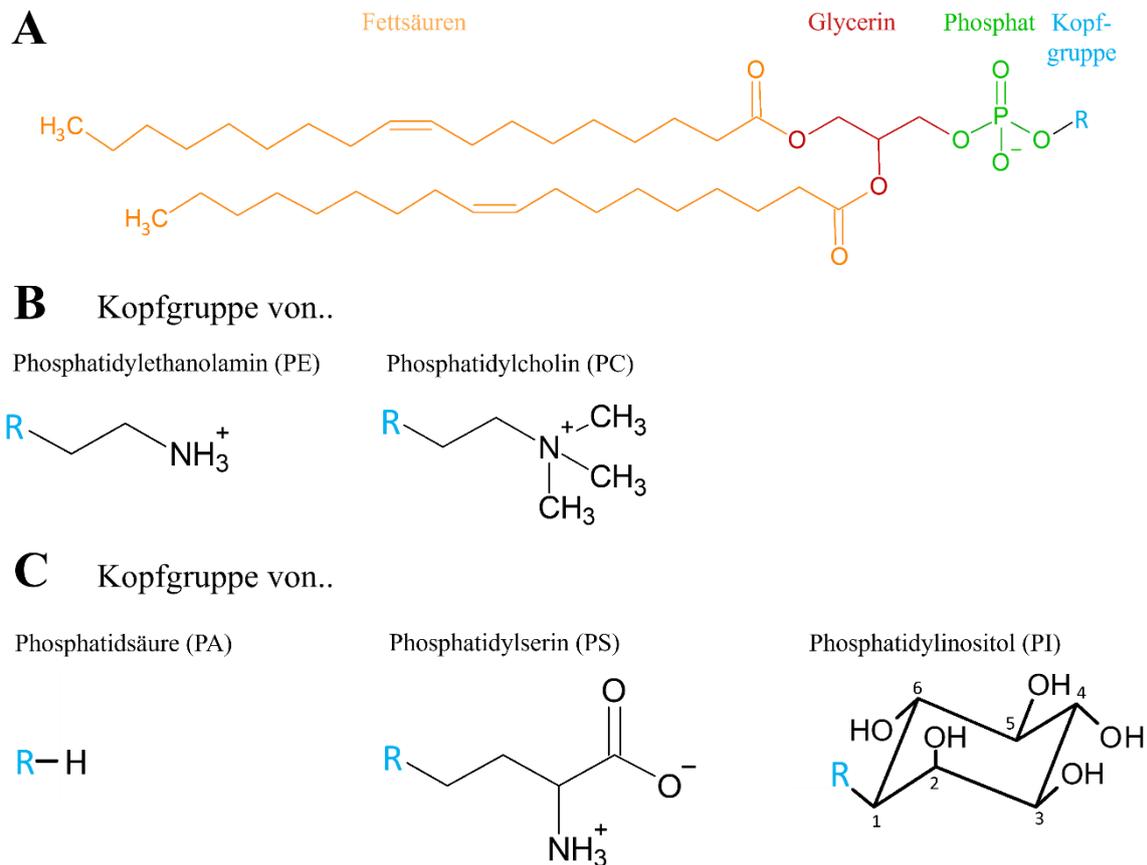


**Abbildung 1: Funktionen biologischer Membranen am Beispiel einer Pflanzenzelle.** Die Plasmamembran grenzt eine Zelle von ihrer Außenwelt ab. Innerhalb der Zelle werden Kompartimente mithilfe von Membranen umschlossen (hellblaue Linien). Vesikel werden ausgehend vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) gebildet und durch die Zelle transportiert. An der Plasmamembran finden viele zelluläre Prozesse statt, unter anderem der Transport in oder aus einer Zelle. Signale von der Außenwelt werden über Rezeptoren wahrgenommen und über Signaltransduktion in der Zelle verarbeitet. Das Zytoskelett ist an der Membran verankert. Über diverse Prozesse können Proteine an die Membran rekrutiert werden. Der Vesikelverkehr, sowie Endozytose und Exozytose (Sekretion) finden an der Plasmamembran statt. Abbildung modifiziert nach Heilmann, 2016.

## 1.2 Strukturlipide und Signallipide

Eine Membran erhält ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften durch die Natur ihrer Bestandteile, der Lipide. Eine Plasmamembran besteht zu einem großen Teil aus Glycerolipiden. Glycerolipide beinhalten ein Glycerinrückgrat, an welchem zwei hydrophobe Fettsäuren und eine hydrophile Kopfgruppe verestert vorliegen, was den amphiphilen Charakter dieser Lipide begründet. In wässriger Umgebung bilden amphiphile Glycerolipide Lipid-Doppelschichten mit einem hydrophoben Inneren und einer äußeren Grenzfläche, die durch die hydrophilen Kopfgruppen gebildet wird. Lipide werden über diese Kopfgruppen definiert. Eine wichtige Klasse an Lipiden sind Phospholipide, deren Kopfgruppe eine Phosphatgruppe enthält, welches mit polaren Strukturen verestert sein kann (Ohlrogge und Browse, 1995; Furt et al., 2010). Ein allgemeiner Aufbau ist in Abbildung 2A dargestellt. Phospholipide können in Struktur- und Signallipide unterteilt werden.

Phosphatidylcholin (PC), welches eine veresterte Cholingruppe am Phosphat besitzt und Phosphatidylethanolamin (PE), mit einer veresterten Ethanolamingruppe am Phosphat stellen die mengenmäßig am stärksten vertretenen Lipide der Plasmamembran dar und sind somit Strukturlipide (Furt et al., 2010). Die Kopfgruppen der Strukturlipide sind in Abbildung 2B zu sehen.



**Abbildung 2: Allgemeiner Aufbau von Phospholipiden und Struktur verschiedener Lipidklassen.** A) Es ist der allgemeine Aufbau von Phospholipiden präsentiert. Zwei Fettsäuren (orange) sind an einem Glycerinrückgrat (rot) verestert. In dieser Abbildung sind beispielhaft zwei Ölsäurereste am Glycerin dargestellt. An der dritten Hydroxygruppe des Glycerins befindet sich ein verestertes Phosphat (grün). Daran können verschiedene Reste (blau) verestert sein, die die Kopfgruppen bilden und die Lipidklassen definieren. Im unteren Bereich sind die chemischen Strukturen der Kopfgruppen von Strukturlipiden (B), bzw. Signallipiden (C) gezeigt. Das R (blau) bezeichnet den Rest des Lipids (Phosphat, Glycerinrückgrat, Fettsäuren). Phosphatidylinositol kann an den Positionen D3, D4, D5 phosphoryliert werden. Die phosphorylierten Lipide werden als Phosphoinositide bezeichnet. Die Abbildung wurde mit ChemSketch erstellt.

Signallipide sind in einer Membran mengenmäßig deutlich geringer vertreten, spielen aber bei physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle. In Abbildung 2C sind repräsentative Signallipide strukturell dargestellt. Signallipide können in Mikrodomänen angereichert sein (Furt et al., 2010; Cacas et al., 2012) und die Eigenschaften von Membranen lokal modifizieren, indem sie zum Beispiel aufgrund ihrer Kopfgruppe die elektrische Ladung verändern oder eine Krümmung der Membran hervorrufen (Noack und Jaillais, 2020). Signallipide können aber auch Proteine rekrutieren, die Einflüsse auf diverse zelluläre

Prozesse haben (Gerth et al., 2017b; Noack und Jaillais, 2020; Cockcroft, 2021). Sie sind außerdem notwendig zum Verarbeiten von Reizen. Als sessile Lebewesen sind Landpflanzen diversen Reizen ausgesetzt. Pflanzen müssen daher schnell und effizient auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren können. Dabei spielen Phosphoinositide eine wichtige Rolle. Diese Phospholipide enthalten als Kopfgruppe Inositol, einen C6-Ring, der an allen Positionen Hydroxygruppen trägt (Abbildung 2C, rechts). Das Inositol kann an verschiedenen Stellen phosphoryliert werden. Phosphoinositide sind bei der Entwicklung von Pflanzen essenziell (Thole und Nielsen, 2008; Munnik und Nielsen, 2011; Boss und Im, 2012; Heilmann und Heilmann, 2015). Es wurde gezeigt, dass Phosphoinositide eine entscheidende Rolle bei der Polarität von Zellen und bei der Kontrolle der Dynamik des Zytoskeletts spielen (Mei et al., 2012; Tejos et al., 2014). Ionenkanäle und andere Transmembranproteine, bzw. membran-assoziierte Proteine werden ebenfalls durch Phosphoinositide beeinflusst (Ma et al., 2009; Jaillais und Ott, 2020). Zelluläre Prozesse direkt an der Plasmamembran wie Endo- und Exozytose werden unter anderem von Phosphoinositiden gesteuert (Sousa et al., 2008; Zhao et al., 2010). Reaktionen wie bspw. Salzstress können einen Einfluss auf Signallipide haben (Hirayama et al., 1995). Dadurch können weitere Stoffwechsel- und Stressreaktionen erfolgen. In Pollenschläuchen spielen Phosphoinositide eine wichtige biologische Rolle, um das polare Spitzenwachstum zu ermöglichen, das den Kontakt zwischen Pollenschlauchzellen und der Eizelle bedingt (Stenzel et al., 2008; Ischebeck et al., 2011; Fratini et al., 2021).

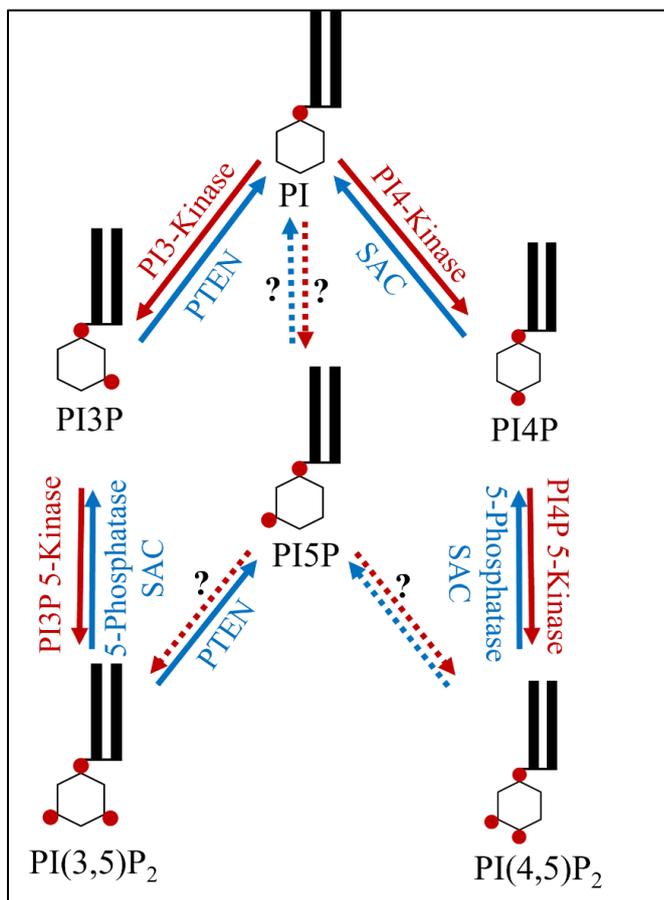
Signallipide wie Phosphatidylinositol Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) können durch das Enzym Phospholipase C in Diacylglycerol und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) gespalten werden. Diese agieren besonders in tierischen Organismen als *second messenger* und können somit Stoffwechselwege beeinflussen und bspw. Proteinkinasen aktivieren (Gerth et al., 2017b). Es ist jedoch nach wie vor nicht klar, ob dies auch in Pflanzen eine biologische Relevanz besitzt. Die Physiologie wird in Pflanzen in den meisten Fällen durch intakte Signallipide beeinflusst. Diese rekrutieren verschiedene Proteine an Membranen. Aufgrund der Exposition der Kopfgruppe in das Zytosol können Proteine daran binden. Dadurch können über Signalkaskaden Stoffwechselreaktionen an einer Membran erfolgen. Eine solche temporäre Rekrutierung kann unter anderem mithilfe von strukturierten Domänen erfolgen, deren Lipidbindungen auf speziellen Aminosäuremotiven basieren. Bei der *Phox-homology* (PX) Domäne handelt es sich bspw. um eine Sequenz zwischen 110 und 130 Aminosäuren. Die PX-Domäne besitzt eine Tasche, die spezifisch Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) bindet (Jia et al., 2014) und eine weitere Tasche, die PIP<sub>2</sub> oder Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) binden kann (Chandra et al., 2019). Ein weiteres prominentes Beispiel ist

die FYVE-Domäne. Der Name leitet sich von den Proteinen ab, in denen die Domäne erstmals entdeckt wurde: Fab1b, YOTB, Vac1b, EEA1 (Stenmark et al., 2002). Mit 60 – 80 Aminosäuren handelt es sich um die kleinste bekannte lipidbindende Domäne. Ein konserviertes Aminosäuremotiv ist notwendig für die Bindung von PI3P oder selten Phosphatidylinositol-5-Phosphat (PI5P) (Kutateladze und Overduin, 2001). Die am häufigsten vorkommende lipidbindende Domäne ist die *Pleckstrin-homology* Domäne (PH-Domäne). Diese besitzt ähnlich wie die PX-Domäne zwei Lipidbindungsregionen, die unterschiedlich hohe Affinitäten zu Phosphoinositiden haben. Die PH-Domänen einiger Proteine zeigen eine Spezifität gegenüber PI(4,5)P<sub>2</sub> und/oder PIP<sub>3</sub>. Für viele PH-Domänen ist aber bekannt, dass eine Reihe von Phosphoinositiden gebunden werden kann (Naughton et al., 2018). Neben der Lipidbindung mithilfe globulärer Domänen können auch kurze unstrukturierte Aminosäuresequenzen aufgrund ihrer basischen und hydrophoben Eigenschaften anionische Phospholipide binden. So wurden bspw. lipidbindende Eigenschaften tierischer Myosine der Klasse I identifiziert, die auf einer kurzen unstrukturierten Aminosäuresequenz basieren (Brzeska et al., 2010). Ein anderes Beispiel ist *Rho of Plants 6* (ROP6) aus *Arabidopsis thaliana*, welches an Membranen assoziiert, indem es mithilfe einer polybasischen Region direkt an anionische Phospholipide bindet (Launhardt, 2017; Platre et al., 2019).

### 1.3 Die Phosphoinositid-Biosynthese in Pflanzen

Phosphoinositide sind eine Klasse chemisch eng verwandter Signallipide, die sich in den Phosphorylierungsmustern der Inositol-Kopfgruppe unterscheiden (Abbildung 2C, rechts). Phosphoinositide befinden sich in der Plasmamembran sowie an diversen Membranen von Organellen und Vesikeln und üben Einfluss auf verschiedene relevante Aspekte der Physiologie von Pflanzenzellen aus. Je nachdem welches Phosphoinositid sich an einer Membran befindet, können unterschiedliche zelluläre Effekte auftreten. Die Hauptreaktionen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Phosphoinositiden in Pflanzen sind in Abbildung 3 dargestellt. Ausgangssubstrat aller phosphorylierten Phosphoinositide ist Phosphatidylinositol (PI), welches aus D-myo-Inositol und Cytidindiphosphat-Diacylglycerin synthetisiert wird. Der Inositolring ist an der Stelle D1 über ein Phosphat am Glycerinrückgrat verestert und kann an den Hydroxygruppen D3, D4 und D5 phosphoryliert werden. Aus sterischen Gründen ist die Phosphorylierung an den Positionen D2 und D6 kaum möglich und somit biologisch irrelevant. Das Genom von *A. thaliana* codiert für *vacuolar protein sorting 34* (VPS34), eine PI 3-Kinase, die die Phosphorylierung von PI zu PI3P katalysiert (Welters

et al., 1994); (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Die Degradation von PI3P zu PI erfolgt über eine Phosphatase aus der Familie der *phosphatase and tensin homologe deletion on chromosome 10* (PTENs). PI3P kann aber auch als Substrat für PI3P 5-Kinasen dienen, welche ein weiteres Phosphat an die Position D5 verestern und somit Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P<sub>2</sub>) synthetisieren. In *A. thaliana* existieren vier Isoformen dieser Kinase (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Es ist möglich, dass mithilfe von PTENs aus PI(3,5)P<sub>2</sub> das Produkt PI5P entsteht. Die Synthese dieses Lipides ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt und PI 5-Kinasen, die PI5P direkt aus PI synthetisieren sind in Pflanzen bisher nicht gefunden worden. PI(3,5)P<sub>2</sub> dient auch als Substrat von 5-Phosphatasen (in *A. thaliana* sind 15 Isoformen annotiert) und *suppressor of actin (SAC)*, einer weiteren Familie von Lipid-Phosphatasen. In *A. thaliana* sind neun Isoformen annotiert. Dabei entsteht wiederum PI3P.



**Abbildung 3: Synthese und Abbau pflanzlicher Phosphoinositide.** Wichtige Synthese- (rote Pfeile) und Abbaureaktionen (blaue Pfeile) im Phosphoinositidnetzwerk von Pflanzen. Die einzelnen Phosphoinositide sind schematisch dargestellt, wobei das Hexagon den Inositolring, die roten Punkte die Phosphate und die schwarzen Balken Fettsäuren repräsentieren. An den Pfeilen sind die entsprechenden annotierten Enzyme beschrieben, die die jeweilige Reaktion katalysieren. Dabei ist anzumerken, dass in *A. thaliana* verschiedene Isoformen der Enzymklassen existieren, die teilweise in ihrer Spezifität variieren. Bei gestrichelten Pfeilen werden die Reaktionen und die entsprechenden Enzyme diskutiert, welche jedoch noch nicht gefunden oder beschrieben wurden. PI – Phosphatidylinositol, PI3P – Phosphatidylinositol-3-Phosphat, PI4P – Phosphatidylinositol-4-Phosphat, PI5P – Phosphatidylinositol-5-phosphat, PI(3,5)P<sub>2</sub> – Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, PI(4,5)P<sub>2</sub> –

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, PTEN – *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*, SAC – *suppressor of actin*.

Ein weiteres Signallipid stellt Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) dar. Es entsteht bei der Phosphorylierung von PI an der Position D4. Dieses wird von PI 4-Kinasen katalysiert. Es sind zwei Subfamilien mit jeweils zwei Isoformen in *A. thaliana* beschrieben (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Die Degradation zu PI erfolgt bspw. über SAC-Phosphatasen (Thole et al., 2008). Theoretisch wäre eine Phosphorylierung an der Position D3 möglich. Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PI(3,4)P<sub>2</sub>) wurde bisher jedoch nur in tierischen Organismen gefunden und scheint in Pflanzen nicht zu existieren, bzw. keine biologische Relevanz zu haben. Durch eine Phosphorylierung an der Position D5 entsteht Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>). Dabei handelt es sich um eines der am besten untersuchten Signallipide in Pflanzen. Die Synthese erfolgt mithilfe von Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinasen (PI4P 5-Kinasen).

### 1.4 Aufbau und Funktion der PI4P 5-Kinasen

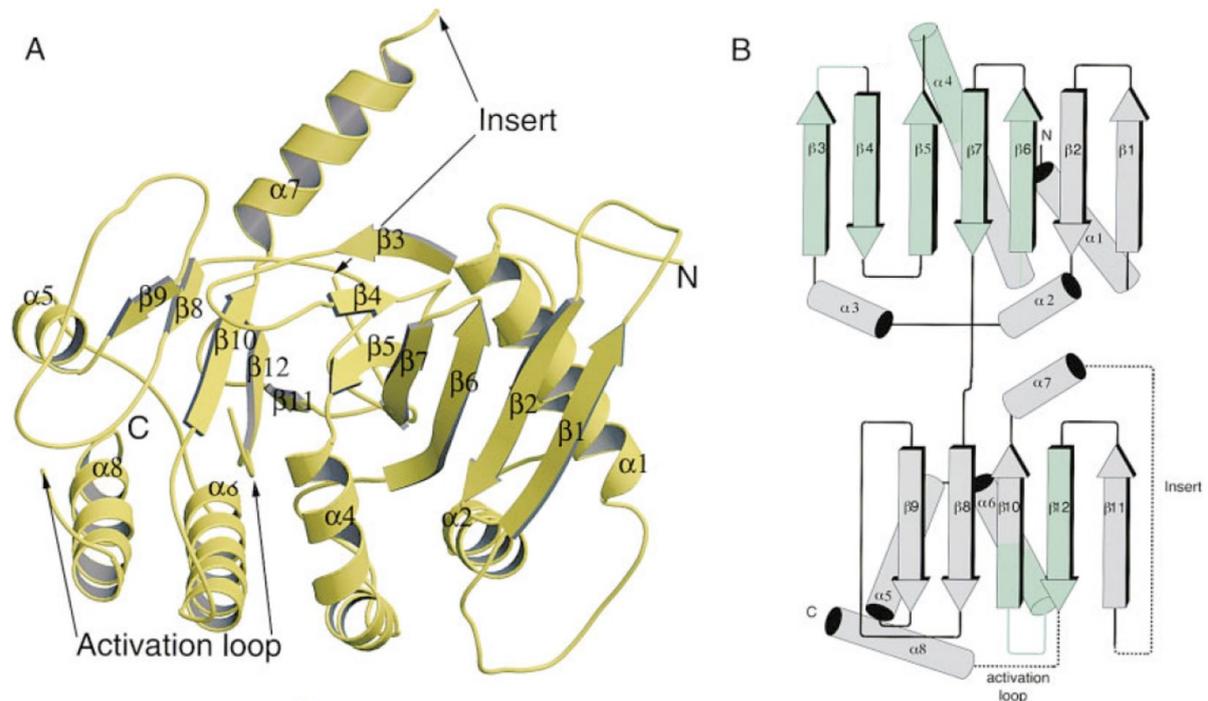
Aufgrund der Tatsache, dass PI(4,5)P<sub>2</sub> einen großen Einfluss auf die Physiologie von Pflanzen besitzt, ist es von großem Interesse, wie dieses Lipid gebildet wird. Die Synthese von PI(4,5)P<sub>2</sub> aus PI4P wird von PI4P 5-Kinasen katalysiert. In *A. thaliana* treten PI4P 5-Kinasen als Enzymfamilie mit elf Mitgliedern auf, die anhand ihrer Domänenstrukturen in zwei Subfamilien unterteilt werden können. Subfamilie A besteht dabei aus zwei Isoformen (PIP5K10 und PIP5K11) und Subfamilie B aus neun Isoformen (PIP5K1 – PIP5K9) (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Die Domänenstrukturen der PI4P 5-Kinase Subfamilien A und B sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Domänenstruktur von PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana*.** Die elf Isoformen von PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana* können in zwei Subfamilien eingeteilt werden. Zur Subfamilie A gehören PIP5K10 und PIP5K11, während PIP5K1 – PIP5K9 zur Subfamilie B gehören. Beiden Familien sind die konservierte Dimerisierungsdomäne (Dim), katalytische Domäne (Cat), der Aktivierungsloop (AI) und ein variabler Einsatz (vI) gemein. Die Subfamilie B hat noch zusätzlich eine variable Linkerregion (Lin), eine konservierte *membrane occupation and recognition nexus repeat* (MORN)-Domäne, welche aus 7 – 8 spezifischen Motiven besteht und einer N-terminalen Region (NT).

PI4P 5-Kinasen werden über ihre charakteristische katalytische Domäne und die Dimerisierungsdomäne definiert, die in PI4P 5-Kinasen aller eukaryotischen Organismen

konserviert sind. Die katalytische Domäne ist an der Membran assoziiert und bindet im aktiven Zentrum PI4P und zugleich ATP, welche zu PI(4,5)P<sub>2</sub> und Adenosindiphosphat (ADP) reagieren. Allen PI4P 5-Kinasen gemeinsam ist weiterhin der Aktivierungsloop. Der Aktivierungsloop scheint wichtig für die Assoziation an die Membran und somit für die Substratbindung zu sein (Liu et al., 2016). Die katalytische Domäne enthält außerdem ein variables Insert von jeweils etwa 100 Aminosäuren, dessen Funktionen noch ungeklärt ist. Um weitere Informationen zum Protein wie Katalysemechanismus und Regulationsmöglichkeiten zu erhalten, sind strukturelle Informationen notwendig. Nach wie vor stellt die Strukturaufklärung von Transmembranproteinen und Membran-assoziierten Proteinen eine Herausforderung in der Proteinbiochemie dar. Es konnten jedoch PI4P 5-Kinasen der Subfamilie A aus dem Zebrafisch *Danio rerio* (Hu et al., 2015) und aus dem Menschen *Homo sapiens* (Rao et al., 1998) kristallisiert und ihre Struktur aufgeklärt werden. Bisher wurden keine weiteren PI4P 5-Kinasen strukturell aufgeklärt. Jedoch wird anhand der vorhandenen Strukturen ersichtlich, dass sich beide Proteine stark ähneln. Die gelösten Strukturen von PI4P 5-Kinasen zeigen Ähnlichkeit zur Faltung von Proteinkinasen, wie bspw. Proteinkinase A (PKA) aus der Maus (Zheng et al., 1993), und es wird davon ausgegangen, dass sich PI4P 5-Kinasen im Laufe der Evolution aus Proteinvorfürern entwickelt haben, die Proteinkinasen ähnelten. Darüber hinaus weisen PI4P 5-Kinasen spezielle Anpassungen zur Ermöglichung der Membranbindung und zur Interaktion mit anionischen Substratlipiden auf (Rao et al., 1998; Burden et al., 1999; Hu et al., 2015). So zeigen Regionen um die Substratbindungsstellen eine abgeflachte und vorwiegend positiv geladene Oberfläche, wahrscheinlich zur besseren Interaktion mit negativ geladenen Membranbereichen (Burden et al., 1999). Die allgemeine Struktur der konservierten Bereiche der PI4P 5-Kinasen wird in Abbildung 5 durch die menschliche PIPKII $\beta$  repräsentiert. Eine strukturelle Aufklärung des variablen Inserts und des Aktivierungsloops konnten aufgrund ihrer Flexibilität nicht über Kristallographie erfolgen. NMR-basierte Studien zeigen, dass das Peptid des Aktivierungsloops nach Assoziation mit Mizellen eine  $\alpha$ -Helix bildet (Liu et al., 2016). Anhand der Kristallstruktur der beiden PI4P 5-Kinasen aus Menschen und Zebrafisch wurde gezeigt, dass PI4P 5-Kinasen sich zu Dimeren zusammenlagern können.



**Abbildung 5: Tertiärstruktur der menschlichen PIPKIIβ.** A) Cartoon-Darstellung der PIPKIIβ (Monomer). Die Struktur wurde mithilfe der Kristallographie aufgeklärt. Das variable Insert und der Aktivierungsloop zeigen aufgrund der Flexibilität keine einheitliche Struktur. Die Substratbindung erfolgt an der Seite des Aktivierungsloop. B) Schema der Faltung von PIPKIIβ. Die Elemente der konservierten ATP-Bindungsregion sind grün dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Rao et al., 1998.

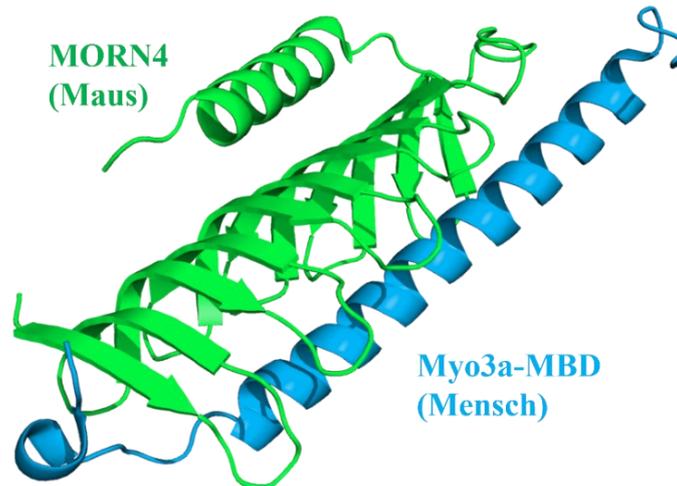
Strukturelle Analysen pflanzenspezifischer PI4P 5-Kinasen sind bislang nicht erfolgreich gewesen, obwohl Subfamilie A aus *A. thaliana* dem allgemeinen Aufbau von PI4P 5-Kinasen ähnelt. Subfamilie B aus *A. thaliana* besitzt weitere pflanzenspezifische Domänen am N-Terminus, die in ihrer Funktion noch größtenteils ungeklärt sind. Die Linkerregion ist in allen Isoformen der Subfamilie B zu finden und enthält hochvariable Sequenzbereiche. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich einen wichtigen Teil für die Funktion der PI4P 5-Kinasen darstellt (Stenzel et al., 2012; Fratini et al., 2021). Außerdem wurde in der Linkerregion von PIP5K2 aus *A. thaliana* eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) gefunden, die experimentell als funktionales Element des aktiven Kernimportes charakterisiert wurde (Gerth et al., 2017b). Daher scheint der Linker auch einen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine zu haben. Ein weiterer außergewöhnlicher Teil ist die *membrane occupation and recognition nexus repeat*-Domäne (MORN-Domäne). Diese besteht aus speziellen MORN-Motiven, bei denen sich hydrophobe Aminosäuren und Glycine zwischen basischen Aminosäuren befinden. Die allgemeine Aminosäuresequenz (Einbuchstaben-Code) lautet: Y-X-G-X-(W/F)-(X)<sub>6</sub>-G-X-G-(X)<sub>6</sub>-G-(X)<sub>2</sub>, wobei X größtenteils basische Aminosäuren repräsentiert. Eine MORN-Domäne wurde erstmals im menschlichen Junctophilin JP-1 beschrieben und als lipidbindende Domäne charakterisiert (Takeshima, 2000). Mittlerweile sind viele verschiedene Proteine bekannt, die MORN-Motive

beinhalten oder sogar gänzlich nur aus MORN-Motiven bestehen. Diese Proteine werden weitestgehend mit Prozessen der Membranassoziation in Verbindung gebracht, scheinen aber auch weitere wichtige Funktionen zu haben: *Toxoplasma gondii*, ein Vertreter der *Apicomplexa*, besitzt das Protein MORN1, welches eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielt (Gubbels et al., 2006). Ein weiterer Parasit, *Trypanosoma brucei*, besitzt einen asymmetrischen Proteinkomplex mit MORN1, der eine Verbindung zwischen Zytoskelett und Endomembransystem bildet (Morriswood, 2015). Weiterhin wurde im Menschen das Protein MORN3 in einem Proteinkomplex als Krebs-Antigen mit onkogenen Funktionen in Zusammenhang gebracht. MORN3 scheint dabei Modifikationen des wichtigen DNA-Reparaturfaktors p53 zu regulieren (Liang et al., 2018). Auch die Histon-Methyltransferase Set7/9 besitzt MORN-Motive und methyliert die Histone H1 und H3 und auch andere Nicht-Histon-Substrate, wie bspw. manche Transkriptionsfaktoren (Vasileva et al., 2020). In den zuletzt genannten Fällen wurde gezeigt, dass die MORN-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (Vasileva et al., 2020).

Es ist gegenwärtig umstritten, ob die MORN-Domäne pflanzlicher PI4P 5-Kinasen eine Lipidbindung und/oder Membranassoziation vermittelt. Ohne die MORN-Region gesondert zu betrachten, wurde gezeigt, dass der N-terminale Bereich von PI4P 5-Kinasen der Arabidopsis Subfamilie B die Membranassoziation dieser Lipid-Kinasen beeinflussen kann (Stenzel et al., 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass die N-terminalen Domänen einen möglichen autoinhibitorischen Einfluss auf die enzymatische Aktivität ausüben (Im et al., 2007; Stenzel et al., 2012). Es wurde experimentell dargestellt, dass eine Phosphorylierung im variablen Insert der PIP5K6 eine Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge hat. Weiterhin wurden Analysen mithilfe der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie durchgeführt. Es wurden strukturelle Änderungen detektiert, wenn ein Phosphorylierungsmimikry (eine Mutation von Threonin zu Aspartat) stattgefunden hat (Hempel et al., 2017). Eine mögliche Interpretation wäre, dass der N-terminale Bereich mithilfe von Phosphorylierungen eine Konformationsänderung erfahren kann und dadurch die enzymatische Aktivität reduziert wird. Lokalisationsstudien verkürzter PI4P 5-Kinase-Varianten aus *A. thaliana* ohne MORN-Domäne zeigten teils verminderte, teils keine verminderte Assoziation mit der Plasmamembran von Pollenschlauchzellen (Ischebeck et al., 2011; Stenzel et al., 2012). Eine etwaige Beteiligung der MORN-Domänen an der Vermittlung der Lipidbindung ist daher ungeklärt.

In *Drosophila melanogaster* wurde erstmals ein Protein mit MORN-Motiven, Retinophilin, in Verbindung mit einem Myosin der Klasse III gebracht (Mecklenburg et al., 2010). Eine

Interaktion zwischen MORN-Proteinen und Myosinen wurde erstmals 2019 von der Gruppe um Li (Li et al., 2019) entdeckt. Dies war auch die erste strukturelle Aufklärung eines MORN-Proteins im Komplex mit einem Partnerprotein, dass spezifisch an eine MORN-Region bindet (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Kristallstruktur des MORN4/Myo3a-Komplexes.** Das Protein MORN4 aus *Mus musculus* (Maus) ist grün dargestellt und interagiert mit der blau dargestellten MORN-bindenden Domäne (MBD) des Myosins der Klasse III (Myo3a) aus *Homo sapiens* (Mensch). PDB-code: 6JLE. Die Darstellung wurde mit PyMOL erstellt.

Obwohl in dieser Studie eine Interaktion zwischen zwei Proteinen aus unterschiedlichen Organismen beschrieben wurde, erlaubt die starke Konservierung der betrachteten Sequenzbereiche eine sinnvolle Interpretation. Die Proteine MORN4 und Myo3a interagieren mit einer sehr hohen Affinität ( $K_D$  von 2,4 nM) (Li et al., 2019), was darauf hinweist, dass MORN-Proteine und MORN-Domänen auch als Strukturproteine agieren könnten. Welchen Einfluss die Bindung der MORN-Region auf Myosine hat, wurde bislang nicht geklärt. Auf der Basis der beschriebenen Daten widmet sich die vorliegende Arbeit der funktionalen Charakterisierung der Interaktion pflanzlicher PI4P 5-Kinasen, die MORN-Domänen enthalten, mit pflanzlichen Myosinen.

## 1.5 Myosine: Eine diverse und komplexe Superfamilie von Proteinen

Neben Kinesinen und Dyneinen spielen Myosine als molekulare Motoren eine entscheidende Rolle in eukaryotischen Zellen. Die Superfamilie der Myosine definiert sich über ihre Motordomäne. Alle bisher untersuchten Myosine haben die gemeinsamen Fähigkeiten, Aktin zu binden, ATP zu hydrolysieren und sich und ggf. auch gebundene *cargo*-Strukturen an Filamenten entlangzubewegen. Mithilfe phylogenetischer Analysen abgeleiteter Proteinsequenzen wurden in verschiedenen eukaryotischen Organismen mehr als 30 Klassen

von Myosinen identifiziert (Odronitz und Kollmar, 2007). Die bekanntesten Vertreter sind die muskulären Myosine der Klasse II, welche auch als konventionelle Klasse der Myosine beschrieben werden. Alle anderen Klassen werden als unkonventionelle Myosine bezeichnet. Die Kategorisierung der Myosine wird über die konservierte Motordomäne definiert, die sich in der Regel am N-Terminus der Myosin-Proteine befindet. Die Motordomäne ist der Bereich, in dem Aktin gebunden wird. Dafür ist die aktinbindende Grenzfläche verantwortlich. Strukturell auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich die nukleotidbindende Domäne, in der ATP zu ADP und  $\gamma$ -Phosphat hydrolysiert wird. Interne Subdomänen erlauben die Kommunikation zwischen aktin- und nukleotidbindenden Bereichen. Dadurch kann chemische in mechanische Energie umgewandelt werden, was Myosine somit zu Mechanoenzymen macht (Sweeney und Holzbour, 2018). Der Mechanismus der Bewegung ist eng mit der Hydrolyse von ATP gekoppelt. In Abwesenheit von Aktin erfolgt die Bindung von ATP. Anschließend wird ATP hydrolysiert und sobald das  $\gamma$ -Phosphat und ADP dissoziieren, erfolgt die Interaktion mit dem Aktin-Filament. Wird ATP erneut gebunden, so löst sich das Myosin vom Aktin und der Kreis beginnt von vorn. Durch eine Oligomerisierung der Myosine ist eine eigenständige Bewegung der Proteine an Aktinfilamenten möglich. Die Kinetik der einzelnen Reaktionsschritte bestimmt maßgeblich die Eigenschaften des Motors. Das heißt, dass die Geschwindigkeit, mit der Myosine sich am Aktinfilament bewegen, und auch die Prozessivität der Myosine, also die Fähigkeit ununterbrochen am Aktinfilament zu bleiben, von der Chemie der ATP-Hydrolyse abhängig ist (Llinas et al., 2012; Sweeney und Holzbour, 2018).

Die meisten Myosine haben N-terminal zusätzlich eine SH3-ähnliche Domäne, deren Funktion in Myosinen noch ungeklärt ist und an die Motordomäne anschließend verschieden viele IQ-Motive. Dabei handelt es sich um die spezielle Aminosäuresequenz I-Q(X)<sub>3</sub>-R-G(X)<sub>3</sub>-R (Aminosäuren nach dem Einbuchstaben-Code; X ist beliebige Aminosäure). Diese ist dafür bekannt, calciumabhängiges Calmodulin zu binden (Rhoads und Friedberg, 1997). In einigen Fällen sind auch *coiled coil* Regionen im C-terminalen Bereich vorhergesagt, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und ggf. bei einer möglichen Oligomerisierung von Myosinen eine Rolle spielen könnten (Hartmann, 2017).

Der C-terminale Bereich eines Myosins ist der variabelste Teil und ermöglicht die Einteilung der Myosine zu einer komplexen Superfamilie. Myosin-C-Termini unterscheiden sich nicht nur in der Länge, sondern auch in der Sequenzvariation. Eine Aufgabe der Myosine ist der Transport von Partikeln und ganzen Organellen („*cargoes*“), der über den C-Terminus vermittelt wird. Während zum Beispiel Myo6 (Klasse VI Myosin) in Säugerzellen unter

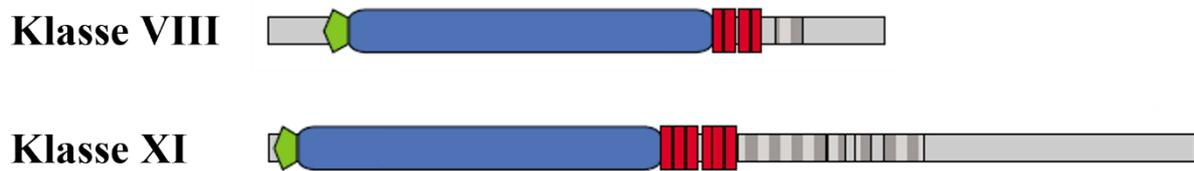
anderem den Transport von Vesikeln durch die Zelle steuern (Aschenbrenner et al., 2004), konnte in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass Myo2p, ein Myosin der Klasse V einen wichtigen Beitrag zum Transport von Peroxisomen leistet (Hoepfner et al., 2001). Lange Zeit wurde angenommen, dass Myosine, abgesehen von der Muskelkontraktion, ausschließlich zum Transport von Organellen und transitorischen subzellulären Partikeln zuständig sind. Es können sich jedoch verschiedene Aminosäuremotive und teilweise sogar ganze Proteindomänen im C-terminalen Bereich befinden, die auf weitere Funktionen deuten. Während beispielsweise PH-Domänen im menschlichen Myosin der Klasse X zu finden sind, die auf eine Bindung an Phospholipide hindeuten, ist bei einem Myosin der Klasse XVII im Pilz *Emericella nidulans* eine Chitin-Synthase annotiert (Odrionitz und Kollmar, 2007). Die Vielfalt der Myosine ist groß und die genaue Funktion einzelner vorhergesagter Sequenzbereiche ist häufig nicht oder nur wenig erforscht. Zum Verhalten unkonventioneller Myosine existieren aber prominente Beispiele, die nicht komplett auf Transportfunktionen zurückzuführen sind. Neben der Lokalisation vom Säuger-Myosin I im Nucleus, wurde bei diesem Motorprotein auch eine nukleäre Funktion nachgewiesen. Dieses Protein hat einen Einfluss auf die Transkription der RNA-Polymerase I (Philimonenko et al., 2004; Ye et al., 2008). Auch ein Myosin der Klasse VI scheint in Säugerzellen die Transkription der RNA-Polymerase II zu erleichtern (Vreugde et al., 2006).

Myosine als aktinbindende Motorproteine stellen eine wichtige Proteinfamilie dar, die in vielen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Je nach Organismus und Kompartiment sind unterschiedliche Klassen an Myosinen zu finden. Trotz der großen Anzahl eukaryotischer Myosinklassen kommen anhand der verfügbaren genomischen Information bei Pflanzen nur zwei Klassen von Myosinen vor: Klasse VIII und Klasse XI.

## 1.6 Die pflanzlichen Myosine

Motorproteine sind in allen eukaryotischen Organismen zu finden. Genomanalysen haben gezeigt, dass Pflanzen üblicherweise mehr Gene für Kinesine besitzen als für Myosine. So hat beispielsweise *A. thaliana* 61 Gene, die für Kinesine und lediglich 17 Gene, die für Myosine kodieren (Reddy und Day, 2001; Mühlhausen und Kollmar, 2013). Trotzdem haben Myosine eine wichtige Rolle in der Physiologie von Pflanzen. Sie sorgen dafür, dass Partikel und Organellen im Zuge der Zytoplasmaströmung bewegt werden und sie können das Aktin-Zytoskelett organisieren. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle beim Wachstum der Pflanze und beim Reagieren auf verschiedene Umweltstresse. Pflanzliche Myosine werden durch die

Myosin-Klasse VIII mit zwei Subtypen und die Myosin-Klasse XI mit acht Subtypen repräsentiert (Mühlhausen und Kollmar, 2013). Eine allgemeine Struktur ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Allgemeine Struktur der pflanzlichen Myosine der Klassen VIII und XI.** Aufbau der pflanzenspezifischen Myosin-Klassen VIII und XI. Die Motordomäne ist blau, das grüne Fünfeck stellt die SH3-Domäne dar und die roten Rechtecke repräsentieren einzelne IQ-Motive (Bei Klasse VIII können 3 – 4 IQ-Motive und bei Klasse XI können 4 – 6 Motive auftreten). Der grau gestreifte Bereich ist eine vorhergesagte *coiled coil* Struktur und graue Regionen sind Sequenzen mit unbekannter Funktion. Modifiziert nach Odronitz und Kollmar, 2007.

### 1.6.1 Pflanzliche Myosine der Klasse XI

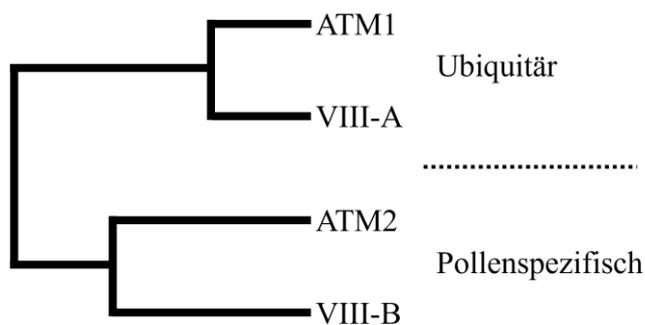
Myosine der Klasse XI besitzen wichtige Transportfunktionen. Anhand der Analyse von *knockout* Mutanten wurden mikroskopische Effekte beobachtet, die mit der Organellenbewegung zu tun haben. So konnte unter anderem beim *knockout* der Isoformen XI-1, XI-2, XI-B, XI-I und XI-K (xi-1/mya1, xi-2/mya2, xi-b, xi-i, xi-k; verschiedene Doppel-, Dreifach- und Vierfachmutanten) gesehen werden, dass die Bewegungen von Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), Golgi-Partikeln, Peroxisomen und Mitochondrien innerhalb der Zellen gestört sind (Peremyslov et al., 2008; Prokhnevsky et al., 2008; Peremyslov et al., 2010; Ueda et al., 2010; Peremyslov et al., 2012). Myosine der Klasse XI werden mit einigen physiologischen Zellprozessen in Verbindung gebracht. So konnte auch dargestellt werden, dass eine Interaktion von Myosin XI-K aus *A. thaliana* mit der GTPase Rab-E14 aus *Physcomitrium patens* für polarisiertes Wachstum der Zellen essenziell ist (Orr et al., 2021). Auch makroskopische Effekte wurden bei fehlender Funktion der Myosine der Klasse XI beobachtet. Beispielsweise konnte experimentell gezeigt werden, dass beim *knockout* der Myosine XI-1, XI-2 und XI-K (xi-1, xi-2, xi-k, verschiedene Doppel- und eine Dreifachmutante) der Gravitropismus von *Arabidopsis* gestört ist und die Pflanzen kaum auf Schwerkraft reagieren können (Talts et al., 2016). Auf molekularer Ebene ist die Myosin-Klasse XI bislang nicht gut verstanden. Hierzu trägt wahrscheinlich bei, dass Myosine besondere Eigenschaften zeigen, die ihre rekombinante Expression und Anreicherung sowie ihre *in vitro* Charakterisierung erschweren. Dazu zählt eine Tendenz zur Aggregation und zur proteolytischen Degradation. In verschiedenen Fällen wurden daher für

enzymologische und enzymkinetische Analysen nur Proteinfragmente, bspw. nur die Motordomänen, betrachtet (Haraguchi et al., 2016; Haraguchi et al., 2022). Nur wenige komplette Myosin-Proteine konnten im Insektenzell-Expressionssystem hergestellt und *in vitro* charakterisiert werden (Tominaga et al., 2003; Tominaga et al., 2013). Besonders interessant für die funktionale Charakterisierung von Motorproteinen ist die Geschwindigkeit, mit der die Myosine sich entlang eines Filaments bewegen können. Solche Geschwindigkeiten wurden nicht immer direkt bestimmt, sondern u.a. über die Geschwindigkeit der Zytoplasmaströmung abgeschätzt. Eine andere Möglichkeit ist beispielsweise die Fixierung der Proteine auf einem Material und das Dazugeben fluoreszenzmarkierter Aktinfilamente. Anschließend kann die Bewegung der Filamente über ihre Fluoreszenz aufgezeichnet und die Geschwindigkeit ermittelt werden (Tominaga et al., 2013). Diverse Analysen ergaben, dass pflanzliche Myosine im Vergleich zu tierischen Myosinen anderer Klassen besonders hohe Geschwindigkeit aufweisen. Besonders beeindruckend ist dabei das Myosin XI-1 aus der Alge *Chara braunii* mit einer Geschwindigkeit von schätzungsweise 70  $\mu\text{m/s}$ . Es handelt sich dabei um das schnellste Motorprotein, was bisher untersucht wurde. Im Vergleich dazu ist die Geschwindigkeit der *A. thaliana* Myosine der Klasse XI nur 6 – 7  $\mu\text{m/s}$ , während das Myosin V aus der Maus *Mus musculus* lediglich 0,3  $\mu\text{m/s}$  schnell ist (Wang et al., 2000; Tominaga et al., 2013; Haraguchi et al., 2022). Die Geschwindigkeit von Myosinen hat einen direkten Einfluss auf die Physiologie der Pflanzen. So wurden zum Beispiel chimäre Myosine hergestellt, in denen die Motordomänen des Myosins XI aus *Chara chorallina*, eines schnellen Motorproteins, bzw. des Myosins Vb aus *Homo sapiens*, eines langsameren Myosins mit der Motordomäne von Myosin XI-2 aus *A. thaliana* getauscht wurden. Dabei wurde beobachtet, dass Pflanzen mit dem neuen schnellen Myosin deutlich größer wurden, während die Pflanzen mit dem neuen langsamen Myosin eher klein blieben (Tominaga et al., 2013). Trotz fehlender Detailinformation zu den exakten Wirkmechanismen pflanzlicher Myosine ist die physiologische Wichtigkeit der Myosine der Klasse XI insgesamt gut belegt und unumstritten.

### 1.6.2 Pflanzliche Myosine der Klasse VIII

Die zweite Gruppe von Myosinen, die ausschließlich in Pflanzen zu finden sind, sind die Myosine der Klasse VIII. Das erste pflanzliche Myosin, das identifiziert wurde, war das *Arabidopsis thaliana myosin 1* oder auch ATM1 (Knight und Kendrick-Jones, 1993). Die ersten Studien zu diesen Proteinen waren Lokalisationsstudien mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen die C-terminale Region von ATM1. Dabei wurde erstmals beschrieben,

dass Myosine der Klasse VIII in höherer Menge an neugebildeten Zellwänden in dem Entwicklungsstadium zu finden sind, bei dem die filamentöse Struktur des Phragmoplasts depolymerisiert. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass Myosine der Klasse VIII die Reifung der Zellplatte beeinflussen. Zusätzlich wurde auch eine Lokalisation an Plasmodesmata beschrieben (Reichert et al., 1999). Später wurden über Sequenzanalysen noch drei weitere Myosine der Klasse VIII in *A. thaliana* gefunden. Dabei bilden Myosin ATM1 und Myosin VIII-A eine phylogenetische Subfamilie, die ubiquitär auftritt, während Myosin ATM2 und Myosin VIII-B eine andere Subfamilie bilden, die laut Arabidopsis eFP Browser Datenbank (Winter et al., 2007) pollenspezifisch exprimiert wird. Ein phylogenetischer Baum der Klasse VIII-Myosine aus *A. thaliana* ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Phylogramm der Myosine der Klasse VIII aus *A. thaliana*.** Mithilfe des bioinformatischen Werkzeugs Clustal Omega (Sievers et al., 2011) wurden die Aminosäuresequenzen der Myosine der Klasse VIII aus *A. thaliana* verglichen, Subfamilien definiert und ein möglicher Stammbaum erstellt. ATM1 und VIII-A gehören zu einer Subfamilie, die ubiquitär exprimiert wird, während ATM2 und VIII-B zu einer anderen Subfamilie zugeordnet werden und pollenspezifisch exprimiert werden.

Weitere Lokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen zeigten, dass Myosine der Klasse VIII in *A. thaliana* besonders an der Plasmamembran zu finden sind. Verkürzte Varianten der Klasse VIII-Myosine ohne Motor- und IQ-Domäne waren in vorherigen Arbeiten weiterhin an der Plasmamembran zu finden, was darauf hindeutet, dass die C-terminale Region dieser Proteine für ihre Membranassoziation essenziell ist (Golomb et al., 2008). Bei einer anderen Lokalisationsstudie mit fluoreszenzmarkierten Myosinen aus *A. thaliana*, die in *Nicotiana tabacum* Blättern transient exprimiert wurden, wurde gezeigt, dass die pollenspezifischen Myosine ATM2 und VIII-B auch im Nucleolus lokalisiert sein können (Avisar et al., 2009). Bisher konnte aber noch keine physiologische Relevanz der Nucleolus-Lokalisation gefunden werden und es ist nicht auszuschließen, dass es sich um ein Artefakt der heterologen Expression handelt. Allgemein ist wenig über die Funktion der Klasse VIII Myosine bekannt. Colokalisations-Experimente deuten auf eine Beteiligung von ATM2 bei der Endozytose hin (Sattarzadeh et al., 2008), aber es ist im Detail unklar,

inwieweit solche zellulären Prozesse von Myosinen der Klasse VIII abhängig sind. Bei *knockout*-Experimenten mit dem Moos *Physcomitrium patens*, bei denen die Expression von Myosinen der Klasse VIII unterdrückt wurde, wurde beobachtet, dass der Phragmoplast bei der Zytokinese keine korrekte Orientierung aufwies und die entstandenen Zellwände schräg ausgeprägt waren. Die Zellen waren zudem im Vergleich zum Wildtyp kleiner, das Moos war verzweigter und die Morphologie des Keimungsstadiums des Mooses war gestört. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass Myosine der Klasse VIII einen Einfluss auf die Hormon-Homöostase haben (Wu et al., 2011). Interessanterweise konnten bisher keine phänotypischen Defekte beim *knockout* aller vier Myosine der Klasse VIII in *A. thaliana* gefunden werden (Talts et al., 2016). Erste enzymkinetische Versuche wurden 2014 mit der rekombinant exprimierten Motordomäne von ATM1 veröffentlicht (Haraguchi et al., 2014). Dabei konnte eine hohe Affinität zum Aktin mit einem  $K_D$  von 4  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Außerdem war unter physiologischen Bedingungen die Freisetzung von ADP aus der Motordomäne der zeitlimitierende Schritt im ATPase-Zyklus für die Motoraktivität. Mit diesem zeitlich limitierenden Schritt ist die Motordomäne länger am Aktin gebunden als bei schnellerem Austausch des Kosubstrates, was die Geschwindigkeit der Bewegung am Aktin herabsetzt. Für das Vollängen-ATM1 wurde eine Geschwindigkeit von 0,2  $\mu\text{m/s}$  bestimmt. Im Vergleich zu den Klasse XI-Myosinen in Pflanzen (1.6.1) handelt es sich somit um „langsame“ Motorproteine mit nur geringer Motoraktivität (Haraguchi et al., 2014). Obwohl die Funktion der Klasse VIII-Myosine bisher noch nicht verstanden ist, wurde aufgrund ihrer Lokalisation und der schwachen Motoraktivität vorgeschlagen, dass es sich um Proteine handelt, die an der Zellperipherie eine kortikale Spannung aufbauen und/oder messen können und die hierzu eine Verbindung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett ausprägen. Ein Mechanismus für eine solche Verbindung wurde aber bislang nicht beschrieben.

## 1.7 Zielstellung

Der Einfluss von PI4P 5-Kinasen auf die Physiologie pflanzlicher Zellen ist aufgrund der Vielseitigkeit bekannter Effekte von PI(4,5)P<sub>2</sub> von großem Interesse. Bisher gibt es kaum Informationen über die molekulare Funktionsweise dieser Proteinklasse. Daher sind enzymkinetische Mechanismen, Interaktionen mit Partnerproteinen und anderen Molekülen, sowie Regulationsvorgänge kaum verstanden. Strukturelle Daten können ein besseres Verständnis zur Proteinbiochemie der PI4P 5-Kinasen ermöglichen und so den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion dieser Proteine besser zugänglich machen.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana* rekombinant zu exprimieren und so anzureichern, dass strukturelle Analysen unter anderem mithilfe von CD-Spektroskopie oder analytischer Ultrazentrifugation möglich sind. Dazu sollten etablierte Expressions- und Anreicherungsverfahren erweitert und die Proteinlösungen mit verschiedenen Analysemethoden untersucht werden. Weiterhin sollten Renaturierungsstrategien getestet werden, um die Reinheit nativer PI4P 5-Kinasen zu erhöhen und somit weitere Analysen zu ermöglichen.

Die Strukturaufklärung eines MORN-Proteins mit einem Myosin (Li et al., 2019) war Grundlage der Hypothese, dass auch die MORN-Domänen pflanzlicher PI4P 5-Kinasen als Interaktionsstellen für Myosine dienen können. Daher sollte mithilfe verschiedener Verfahren getestet werden, ob eine solche Interaktion vorliegt und ob die Interaktion einen wechselseitigen Einfluss auf die physiologische Funktion der Partner ausüben kann.

Myosine der Klasse VIII könnten aufgrund ihrer Lokalisation an der Plasmamembran unabhängig von einer putativen Interaktion mit PI4P 5-Kinasen, mit Lipidbindung in Verbindung gebracht werden. Es ist bekannt, dass PI4P 5-Kinasen einen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett haben können. Der Mechanismus ist aber nach wie vor ungeklärt. Hier wurde daher die Hypothese getestet, dass eine Verbindung von Plasmamembran und Zytoskelett über eine Interaktion von Myosinen der Klasse VIII mit Phosphoinositiden und/oder PI4P 5-Kinasen hergestellt wird. Da Myosine der Klasse VIII bisher kaum *in vitro* untersucht wurden, sollte ein System zur Anreicherung der C-Termini von Myosin ATM2 und Myosin VIII-B etabliert werden, um mit diesen Proteinen Lipidbindungsstudien durchzuführen.

## 2 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich/Merck (München, Deutschland) verwendet.

### 2.1 Medien

Alle Medien wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert (Systec VX-150, Systec GmbH, Linden, Deutschland). Für die Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren für LB-Medium 1,5 % und für YPAD- und SD-Medium 2 % Micro Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande) hinzugefügt.

*Tabelle 1: Verwendete Medien*

Medium	Zusammensetzung
LB	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) NaCl
2YT	1 % (w/v) Hefeextrakt 1,6 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) NaCl 0,2 % (w/v) Glukose
YPAD	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 0,004 % (w/v) Adeninhemisulfat 2 % (w/v) Glukose
SD	0,17 % Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat (Difco, Detroit, USA) 0,5 % Ammoniumsulfat 2 % Glukose 1x Aminosäurestammlösung (ohne LW, bzw. LWH)

Für die SD-Selektionsmedien wurde folgende Aminosäurestammlösung (10x) dem SD-Medium nach dem Autoklavieren hinzugefügt:

Für SD-LW:

- 200 mg/l L-Adenin Hemisulfat-Salz
- 200 mg/l L-Arginin HCl
- 200 mg/l L-Histidin HCl Monohydrat
- 300 mg/l L-Isoleucin
- 300 mg/l L-Lysin HCl
- 200 mg/l L-Methionin
- 500 mg/l L-Phenylalanin
- 200 mg/l L-Serin
- 2000 mg/l L-Threonin
- 300 mg/l L-Tyrosin
- 200 mg/l L-Uracil
- 1500 mg/l L-Valin

Die Aminosäurestammlösung für SD-LWH wurde ohne Zugabe von Histidin hergestellt.

## 2.2 Verwendete Antibiotika

Nach Autoklavieren und kurzem Abkühlen von LB- bzw. 2YT-Medium wurden Antibiotika entsprechend Tabelle 2 hinzugefügt.

*Tabelle 2: Verwendete Antibiotika*

Antibiotikum	Stockkonzentration	Final eingesetzte Konzentration
Carbenicillin	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/ml

## 2.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung und Renaturierung wurden filtriert (Corning® 150 ml Vakuum Filter, 0,22 µm Porengröße, Polyethersulfon-Membran) und für die Verwendung an der ÄKTA™ (GE healthcare, München, Deutschland) zusätzlich entgast.

## 2.4 Phospholipide

Alle Lipide waren von Avanti Polar Lipids Inc., wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und waren in Chloroform gelöst.

*Tabelle 3: Verwendete Phospholipide*

Lipid	Produkt-Nummer
di-18:1 PA (DOPA)	840875
di-18:1 PC (DOPC)	850375
di-18:1 PI(4)P (DOPI4P)	850151
PI(4)P (isoliert aus Schweinehirn)	840045
di-18:1 PI(4,5)P <sub>2</sub> (DOPIP <sub>2</sub> )	850155
di-18:1 PS (DOPS)	840035

## 2.5 Enzyme und Antikörper

*Tabelle 4: Verwendete Enzyme*

Enzym	Hersteller
Bovine Desoxyribonuklease I ( $\geq 5000$ U/mg Protein)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

*Tabelle 5: Verwendete Antikörper. BSA - bovine serum albumin, TBS - tris buffered saline (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5)*

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
<b>primär</b>			
Anti-MBP	Maus	1:10.000 (3 % Milchpulver in TBS)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Anti-Penta-His	Maus	1:2.000 (3 % BSA in TBS)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Anti-GST	Ziege	1:2.000 (3 % Milchpulver in TBS)	GE Healthcare (München, Deutschland)
<b>sekundär</b>			
Anti-Maus (AP)	Ziege	1:30.000 (3 % Milchpulver in TBS)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Anti-Maus (HRP)	Ziege	1:7.500 (3 % Milchpulver in TBS)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Anti-Ziege (AP)	Hase	1:30.000 (3 % Milchpulver in TBS)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Anti-Ziege (HRP)	Hase	1:7.500 (3 % Milchpulver in TBS)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

## 2.6 Kitsysteme

Tabelle 6: Verwendete Kitsysteme

Kit	Hersteller
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
RervertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

## 2.7 Mikroorganismen

Die folgenden Stämme von Mikroorganismen wurden für unterschiedliche experimentelle Ansätze verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Stamm	Hersteller	Genotyp
<i>E. coli</i>	NEB5α	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
<i>E. coli</i>	Rosetta 2 (DE3)	Novagene (bezogen von Merck, Darmstadt, Deutschland)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam<sup>R</sup>)</i>
<i>S. cerevisiae</i>	NMY51	Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz)	<i>MATa, his3Δ200, trp1-901, leu2-3,112, ade2, LYS2::(lexAop)4-HIS3, ura3::(lexAop)8-lacZ (lexAop)8-ADE2 GAL4</i>

## 2.8 Vektoren

Tabelle 8: Verwendete Vektoren

Plasmid	Hersteller	Resistenz	Beschreibung
Champion <i>pET SUMO adapt</i>	Thermo Fisher Scientific, modifiziert von Dr. Eva Bosse Doenecke (ehemalig MLU Halle-Wittenberg)	<i>Kan<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor – ursprünglich Champion pET SUMO. Unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren <i>tac</i> -Promotors befindet sich die Sequenz für einen Hexa-Histidin-tag, gefolgt von einer Thrombinschnittstelle und mit anschließender Sequenz für SUMO,

			abwärts folgt eine eingefügte <i>multiple cloning site</i> ( <i>MCS</i> ).
<i>pET-28a (+)</i>	Novagene (Merck, Darmstadt, Deutschland), zur Gensynthese verwendet von BioCat (Heidelberg, Deutschland)	<i>Kan<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren <i>tac</i> -Promotors befindet sich die Sequenz für einen Hexa-Histidin- <i>tag</i> , mit anschließender Thrombin-Schnittstelle gefolgt von der <i>MCS</i> .
<i>pGEX-6P-1</i>	GE Healthcare, München, Deutschland	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren <i>tac</i> -Promotors befindet sich das Gen für GST (Glutathion-S-Transferase), abwärts folgt die <i>MCS</i> .
<i>pMAL-c5G</i>	New England Biolabs Inc., Frankfurt, Deutschland	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren <i>tac</i> -Promotors befindet sich das <i>malE</i> -Gen zur Produktion von MBP (Maltosebindeprotein), abwärts folgt eine <i>MCS</i> .
<i>pBT3-C-OST4</i>	Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz), modifiziert von Dr. Mareike Heilmann (MLU Halle-Wittenberg)	<i>Kan<sup>R</sup></i>	Ködervektor, basierend auf pBT3-C, aufwärts der <i>MCS</i> wurde <i>OST4</i> (Oligosaccharyl-Transferase 4) über eine XbaI-Schnittstelle eingeführt, abwärts folgt <i>MCS</i> , die C-terminale Hälfte des Ubiquitins mit den AS 34 – 76 (Cub) und der Transkriptionsfaktor LexA-VP16. Zusätzlich enthält der Vektor den Auxotrophiemarker <i>LEU2</i> .
<i>pPR3-N</i>	Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz)	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Beutevektor, abwärts der <i>MCS</i> befindet sich die N-terminale Hälfte des Ubiquitins mit den AS 1 – 33, wobei Isoleucin13 zu Glycin mutiert wurde (Nub). Zusätzlich enthält der Vektor den Auxotrophiemarker <i>TRP1</i> .
<i>pAI-Alg5</i>	Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz)	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Beutevektor, enthält <i>Alg5</i> (Dolichyl-phosphat beta-Glucosyltransferase), abwärts folgt Nub. Zusätzlich enthält der Vektor den Auxotrophiemarker <i>TRP1</i> .
<i>pDL-Alg5</i>	Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz)	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Beutevektor, enthält <i>Alg5</i> , abwärts folgt die N-terminale Hälfte des Ubiquitins mit den AS

			1 – 38, wobei Isoleucin13 zu Glycin mutiert wurde (NubG). Zusätzlich enthält der Vektor den Auxotrophiemarker <i>TRP1</i> .
--	--	--	---

## 2.9 Geräte

Alle spezifischen Geräte werden in der jeweiligen Methode erwähnt. Reaktionsgefäße wurden von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen.

## 2.10 Software

*Tabelle 9: Verwendete Computer-Programme*

Software	Hersteller	Zweck
Chromas 2.6.6	Technelysium Pty Ltd (South Brisbane, Australien)	Analyse DNA-Sequenzen
FusionCapt Advance 17.01	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell, Deutschland)	Detektion Chemilumineszenz von <i>western blots</i>
ImageQuant TL	Cytiva Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)	Analyse für Phosphorimager
Microsoft Office 365 (Excel, Word, Powerpoint)	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)	Bilder Bearbeitung, Datenanalyse, Texte schreiben
NanoDrop 2000 1.4.1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)	UV-Absorption von Protein – und Nukleinsäurelösungen im $\mu\text{l}$ -Maßstab
PyMOL v0.99rc6	DeLano Scientific LLC, Schrödinger Inc.	Bearbeiten von Proteinstrukturen
Spectra Manager 1.53	JASCO Deutschland GmbH (Pfundstadt, Deutschland)	Messung und Auswertung CD-Spektren
Unicorn 5.10	GE Healthcare (München, Deutschland)	Analyse Chromatographie für Äkta

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA aus Arabidopsis

Für die Klonierung der komplementären DNA (cDNA)-Sequenzen diverser Myosinfragmente aus *A. thaliana* wurde cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (3.1.2) benötigt. Dazu wurde etwa 1 mg Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Keimlingen (zur Verfügung gestellt von Dr. Franziska Daamen) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mittels des „RvertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

##### 3.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von DNA für die Klonierung diverser Konstrukte erfolgte mithilfe der PCR. Dabei wurde die Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs Inc., Frankfurt, Deutschland) verwendet. In Tabelle 10 ist die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes gezeigt. Es wurden 2 µl der cDNA als Matrize verwendet, bzw. 1 – 10 ng/µl eines Plasmides. Das PCR-Programm ist in Tabelle 11 dargestellt. Die genutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der PCR-Reaktion**

Bestandteil	Menge [µl]
Matrizen-DNA	1 bzw. 2
Vorwärts-Oligonukleotid [100 µM]	1
Rückwärts-Oligonukleotid [100 µM]	1
Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase	0,5
dNTPs [2,5 mM]	2
5x High Fidelity Phusion Puffer	10
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**Tabelle 11: PCR-Programm**

Schritt	Zyklus	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1. Initiale Denaturierung	1	98	30
2. Denaturierung	2 – 35	98	30
3. Anlagerung	2 – 35	60	30
4. Elongation	2 – 35	72	60 pro kb DNA
5. Finale Elongation	36	72	300

### 3.1.3 Restriktion von DNA

Für die Klonierung, bzw. zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurden PCR-Fragmente, bzw. Plasmid-DNA mithilfe von Restriktionsenzymen verdaut (restringiert). Dazu wurden 1 – 3 µg Plasmid-DNA mit 20 – 30 U entsprechender Restriktionsenzyme bei enzymespezifischer Optimaltemperatur und 1x CutSmart-Puffer (New England Biolabs Inc., Frankfurt, Deutschland) für 2 – 16 h inkubiert. Für den Verdau von PCR-Fragmenten wurde vom Agarosegel gereinigte DNA (3.1.5) verdaut.

Um einen Klonierungserfolg zu überprüfen, wurden etwa 0,1 – 0,5 µg Plasmid-DNA mit 2 U von Restriktionsenzymen und 1x CutSmart-Puffer bei entsprechender Optimaltemperatur für eine Stunde verdaut. Das geschnittene Plasmid wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (3.1.4) analysiert.

### 3.1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Trennung von DNA-Proben mit bis zu 800 bp erfolgte in Agarosegelen mit 2 % (w/v) Agarose, für größere DNA-Fragmente in Gelen mit 1 % (w/v) Agarose in jeweils 1x TAE-Puffer. Als Größenstandards wurden 5 µl von „GeneRuler™ 100 bp DNA ladder“, bzw. „GeneRuler™ 1 kb DNA ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Für die Elektrophorese wurde 1x TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet und die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 130 V für 30 – 60 Minuten. Danach wurden die Gele für 15 – 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert und

anschließend mithilfe des Geldetektionssystems Gel iX Imager (Quantum-ST4-3026-WL/MX, Madrid, Spanien) visualisiert.

**6x DNA-Ladepuffer:** 60 % (v/v) Glycerin, 0,4 % (w/v) Orange G, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylene cyanol PP

**1x TAE-Puffer:** 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA

### 3.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation restringierter Plasmid-DNA oder PCR-Fragmente nach einer Agarose-Gelelektrophorese (3.1.4) aus dem Agarosegel erfolgte mit dem „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel geschnitten und nach Herstellerangaben weiter präpariert. Die finale Elution erfolgte mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von PCR-Fragmenten in ein Plasmid wurde mithilfe der T4-DNA-Ligase erzielt. Dazu wurden in einem 20 µl Ansatz 25 – 50 ng geschnittene Plasmid-DNA mit einem 5-fachen molaren Überschuss an geschnittenem PCR-Produkt, 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl Ligase für 1 - 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Ligase und Puffer wurden von New England Biolabs Inc. (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Der Ansatz wurde anschließend in *E. coli* NEB5α transformiert (3.2.2). Die generierten Konstrukte sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgeführt.

### 3.1.7 Plasmidpräparation aus *E. coli*-Kulturen

Für die Amplifikation von Plasmiden wurden diese in *E. coli* NEB5α transformiert (3.2.2) und eine Kultur von 4 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und bei 180 rpm schüttelnd (Infors HT Minitron, Einsbach, Deutschland) inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 8000 x g und RT sedimentiert. Die Isolation der Plasmide erfolgte mithilfe des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O und die gelösten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.1.8 Klonierungsstrategie zur Herstellung von Fusionskonstrukten

Primer, die zur Klonierung verwendet wurden, sind im Anhang in Tabelle 14 aufgelistet. Eine Beschreibung der Vektoren ist in Tabelle 8 aufgeführt.

#### 3.1.8.1 Konstrukte für rekombinante Proteinexpression

Für die rekombinante Proteinexpression von Myosin-Varianten in *E. coli* wurden codon-optimierte Konstrukte im Vektor *pET28a* verwendet (BioCat, Heidelberg, Deutschland). Für die Fusion der polybasischen Region der Myosine an GST wurden die codon-optimierten Konstrukte als Matrizen-DNA verwendet, mit spezifischen Primern und PCR amplifiziert (3.1.2), mit BamHI und SalI verdaut (3.1.3) und in *pGEX-6P-1* legiert (3.1.6). Für die Fusion von PIP5K2 an SUMO wurde PIP5K2 im pMAL-c5G als Matrizen-DNA mit spezifischen Primern und PCR amplifiziert (3.1.2), mit NotI und XhoI verdaut (3.1.3) und in Champion *pET SUMO adapt* legiert (3.1.6). Die in dieser Arbeit generierten und verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 16 gelistet.

#### 3.1.8.2 Konstrukte für Hefe-Zwei-Hybrid-Studien

Für die Klonierung von Beute-Konstrukten wurde der Vektor pPR3N verwendet. Es wurden verschiedene Vertreter pflanzlicher Myosine und verkürzte Varianten aus cDNA mittels PCR und spezifischen Primern amplifiziert (3.1.2), mit SfiI geschnitten (3.1.3) und anschließend jeweils in den Vektor pPR3N legiert (3.1.6). Für die Köder-Konstrukte wurde der Vektor pBT3C-Ost4 verwendet. In vorherigen Arbeiten wurden verschiedene PI4P 5-Kinasen in den Vektor pBT3C-Ost4 legiert. Die in dieser Arbeit generierten und verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 17 gelistet.

### 3.1.9 Sequenzierung

Die korrekte PCR-Amplifikation und Klonierung wurden durch Sequenzierung der eingebrachten PCR-Fragmente in Plasmide bestätigt. Die Sequenzierung wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurden 250 – 500 ng des Plasmids mit 25 pmol eines vektor- bzw. sequenzspezifischen Oligonukleotids in einem 10 µl-Ansatz eingesetzt. Eine Liste mit den verwendeten Oligonukleotiden ist im Anhang (Tabelle 15) aufgeführt.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Produktion chemokompetenter *E. coli* Zellen der Stämme Rosetta 2 und NEB5 $\alpha$  wurde ein modifiziertes Protokoll von (Inoue et al., 1990)) verwendet. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Vorkultur des entsprechenden Stammes (in LB-Medium) inokuliert und bei 30 °C und schüttelnd bei 200 rpm (New Brunswick™ Innova® 44, Eppendorf AG, Deutschland) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,6 wachsen gelassen. Die Zellsuspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Jeweils 50 ml Aliquots wurden bei 3220 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zelniederschläge wurden in 20 ml gekühltem TBF-Puffer resuspendiert, für 10 min bei 4 °C inkubiert und nochmals bei 3220 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zelniederschläge in 4 ml TBF-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) hinzugefügt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zu je 50  $\mu$ l (*E. coli* Rosetta 2) bzw. 300  $\mu$ l (*E. coli* NEB5 $\alpha$ ) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**TBF-Puffer:** 10 mM HEPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,7

### 3.2.2 Hitzeschock-vermittelte Transformation chemokompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation von Plasmiden in chemokompetenten *E. coli* Zellen erfolgte mithilfe eines Hitzeschocks. Dazu wurde 1  $\mu$ l einer Plasmidlösung, bzw. 20  $\mu$ l eines Ligationsansatzes (3.1.6) mit 100  $\mu$ l chemokompetenter Zellen (3.2.1) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock mit 42 °C für 60 s. Es wurden 900  $\mu$ l LB-Medium hinzugefügt und die Zellsuspension für 45 – 60 min bei 37 °C inkubiert. Für transformierte Ligationsansätze wurden die Zellen bei 5000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 50  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde dann komplett auf LB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Für alle weiteren Transformationen wurden 50  $\mu$ l der 1 ml-Zellsuspension auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.2.3 Herstellung und Transformation chemokompetenter *S. cerevisiae*

Die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte mit Hilfe des Split-Ubiquitin-basiertem Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (3.6.1.2). Hierfür wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* NMY51 mit verschiedenen Beute- und Köderplasmiden transformiert. Die Herstellung chemokompetenter Zellen und die Transformation der Plasmide erfolgten nach dem Protokoll von (Ito et al., 1983). Dazu wurde eine Vorkultur des Hefestammes in 20 ml YPAD-Medium bei 30 °C und schüttelnd bei 150 rpm (New Brunswick™ Innova® 44, Eppendorf AG, Deutschland) über Nacht inkubiert. Für die Transformation von sieben Ansätzen wurde eine Hauptkultur von 50 ml YPAD-Medium mit 2 - 4 ml der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 angeimpft und bei 30 °C und schüttelnd bei 150 rpm (New Brunswick™ Innova® 44, Eppendorf AG, Deutschland) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500 x g und 4 °C für 5 min sedimentiert, der Überstand entfernt und in 20 ml TE-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Suspension für 5 min bei 1500 x g und 4 °C erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Zellniederschlag wurde anschließend in 1 ml LiOAc/TE-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für wenige s bei 21.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 700 µl LiOAc/TE-Puffer resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert.

Für die Transformation wurden jeweils 1 – 1,5 µg Köder- und Beuteplasmid (Tabelle 17) mit 100 µl der chemokompetenten Hefezellen und 700 µl PEG/LiOAc gemischt und bei 30 °C und 800 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Deutschland) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 80 µl DMSO hinzugefügt, schnell gemischt und für 16 min bei 42 °C inkubiert. Die Suspension wurde bei 21.000 x g für wenige s zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde in 300 µl 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert, erneut bei 21.000 x g für wenige s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde der Niederschlag in 150 µl 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert, 100 µl des Ansatzes auf SD-Selektionsfestmedium (-LW) ausplattiert und für fünf bis sieben Tage bei 30 °C inkubiert. Es konnten nur Hefezellen auf entsprechendem Selektionsmedium wachsen, in denen sowohl Köderplasmid (pBT3C-OST4, vermittelt Leucin-Synthese), als auch Beuteplasmid (pPR3N, vermittelt Tryptophan-Synthese) transformiert waren.

**LiOAc/TE-Puffer:** 100 mM Lithiumacetat in 1x TE-Puffer

**PEG/LiOAc:** 100 mM Lithiumacetat, 40 % (w/v) PEG-4000 in 1x TE-Puffer

**TE-Puffer:** 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

### 3.2.4 Erzeugung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Produktion von Proteinen wurden *E. coli* Rosetta2 Zellen verwendet, die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden (3.2.2). Dieser *E. coli*-Stamm zeichnet sich durch den Besitz von tRNAs aus, die für die Expression eukaryotischer Gene benötigt werden. Es wurde eine 50 ml 2YT-Vorkultur angelegt und über Nacht bei 37 °C angezogen. Eine Hauptkultur wurde mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 – 0,1 inokuliert und bei 37 °C und schüttelnd bei 120 rpm (New Brunswick™ Innova® 44, Eppendorf AG, Deutschland) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 erreicht wurde. Für die Produktion von Proteinen mit 11 Hauptkulturen wurden 5 l Schikanekolben verwendet. Die Induktion der heterologen Genexpression erfolgte mit dem Laktose-Strukturanalogon IPTG. Dadurch wird in den Zellen die Dissoziation des *lac*-Repressors initiiert und dadurch die im Genom codierte T7-RNA-Polymerase exprimiert. Diese bindet am T7-Promotor im transformierten Plasmid, wodurch das Zielgen transkribiert wird (Studier und Moffatt, 1986). Die Induktion erfolgte teilweise bei niedrigeren Temperaturen, daher wurden die Kulturen nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend mit der entsprechenden Konzentration an IPTG induziert und für eine bestimmte Zeit bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Die Parameter für die Expressionsbedingungen der einzelnen Konstrukte ist in Tabelle 12 dargestellt. Nach der Induktion wurden die Zellsuspensionen bei 3200 x g und 4 °C für 20 min sedimentiert, der Überstand verworfen, die Zellniederschläge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 12: Expressionsbedingungen der verwendeten Konstrukte**

Konstrukt	Endkonzentration IPTG [mM]	Temperatur [°C]	Dauer [h]
Myosin-Konstrukte	0,1	37	4
MBP-PIP5K2	1	28	4
SUMO-PIP5K2	1	18	~20
MBP-PIP5K6 SUMO-PIP5K6	0,1	22	4
MBP	1	37	4

### 3.3 Proteinanreicherung

#### 3.3.1 Zellaufschluss zur nativen Proteinisolierung

##### 3.3.1.1 Zellaufschluss mithilfe von Ultraschall

Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen zur Produktion der GST-Myosin VIII-Fusionskonstrukte und für Löslichkeitstests von His<sub>6</sub>-ATM<sub>1941-1166</sub> erfolgte mithilfe von Ultraschall. Dazu wurden die *E. coli* Sedimente aus einer 1 ml-Expressionskultur (3.2.4) bei RT aufgetaut und mit 1 ml GST-Myosin-Aufschlusspuffer, bzw. verschiedenen Testpuffern für His<sub>6</sub>-ATM<sub>1941-1166</sub> (siehe Anhang Abbildung 32, links) versetzt und gemischt. Danach wurden 20 µl 100 x Proteaseinhibitor (S8830, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 2 mM DTT Endkonzentration (bei His<sub>6</sub>-ATM<sub>1941-1166</sub> ohne Reduktionsmittel) zugefügt, vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mithilfe von Ultraschall mit 1000 J Gesamtenergie bei 50 x 2 s Pulsen mit je 20 J und 2 s Unterbrechungen. Die Suspension wurde für 30 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand für den *Lipid-Overlay-Assay* (3.6.2.1) verwendet.

**GST-Myosin-Aufschlusspuffer:** 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10 % Glycerin, 0,1 % Tween-20, pH 7,5 (4 °C)

##### 3.3.1.2 Zellaufschluss mithilfe von Hochdruckdispersion

*E. coli* Zellen aus 0,5 – 1 l-Expressionskulturen wurden mit Hilfe von Hochdruckdispersion aufgeschlossen. Dazu wurden die Sedimente (3.2.4) auf Eis aufgetaut und mit 8 ml Aufschlusspuffer pro g Biofeuchtmasse (BFM) versetzt und resuspendiert. Anschließend wurde eine halbe Protease-Inhibitor-Tablette (S8830, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), sowie Lysozym (final 1 mg/ml) hinzugegeben und bei 4 °C für 30 min rührend inkubiert. Der enzymatische Aufschluss wurde unterstützt mit Hochdruckdispersion (Gaulin Micron Lab 40 Homogenisator, APV). Dabei wurde die Zellsuspension in 3 – 4 Passagen mit Drücken von 300 – 700 bar durch eine enge Öffnung gepresst. Aufgrund der Scherkräfte wurden die Zellen aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 108.860 x g und 4 °C für 60 min (Zentrifuge: Avanti® J-30I, Rotor: JA-30.50 Ti, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 4 U/ml DNase I und 4 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentrationen) versetzt und für 30 min bei RT rührend inkubiert. Aus dem entstandenen Lysat wurden anschließend Proteine über Affinitätschromatographie angereichert (3.3.3).

**MBP-PIP5K2-Aufschlusspuffer:** 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,5 (4 °C)

**MBP-PIP5K6-Aufschlusspuffer:** 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,4 (4 °C)

**ATM1-Aufschlusspuffer:** 750 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (4 °C)

### 3.3.2 Isolation und Solubilisierung von Einschlusskörpern

Die rekombinante Überexpression von Proteinen in *E. coli* hat häufig eine Aggregation der Proteine zur Folge. Diese werden in sogenannten Einschlusskörpern (*Inclusionbodies*, IBs) eingelagert. Mit Hilfe von Solubilisierung der IBs und anschließender Renaturierung der Proteine können diese in eine native und aktive Konformation gebracht werden.

Die Isolation der IBs erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von (Lange und Rudolph, 2008). Dazu wurden Sedimente von *E. coli* in 8 ml IB-Puffer I pro g BFM suspendiert. Nach Zugabe von 1,5 mg Lysozym pro g BFM, wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C rührend inkubiert. Der Aufschluss erfolgte mithilfe von Hochdruckdispersion mit drei Passagen bei 300 – 500 bar (Gaulin Micron Lab 40 Homogenisator, APV). Anschließend wurden 4 U/ml DNase I und 4 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration) der Suspension hinzugegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden 0,5 Volumenteile IB-Myosin-Puffer II (für His<sub>6</sub>-ATM<sub>2972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>920-1134</sub>-IB-Isolation), bzw. IB-PIPK-Puffer II (für PIPK-IB-Isolation) hinzugefügt und die Suspension für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 31.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde abschließend jeweils dreimal in 40 ml IB-Puffer III mithilfe des Ultraturrax (Ultraturrax T-25, Ika-Werke, Staufen) resuspendiert und für 10 min bei 31.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die IBs wurden bis zur Solubilisierung bei -20 °C gelagert.

Um IBs in Lösung zu bringen, wurden pro g IB-Sediment je 5 ml Solubilisierungspuffer verwendet. Der Niederschlag wurde mithilfe des Ultraturrax (Ultraturrax T-25, Ika-Werke, Staufen) resuspendiert und für 1 - 2 h bei RT rührend inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden für 30 min bei 3.220 x g sedimentiert.

**IB-Puffer I:** 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM Na-EDTA

**IB-Myosin-Puffer II:** 60 mM Na-EDTA, 0,6 M NaCl, 6 % Triton X-100

**IB-PIPK-Puffer II:** 60 mM Na-EDTA, 1,5 M NaCl, 6 % Triton X-100

**IB-Puffer III:** 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Na-EDTA

**Solubilisierungspuffer:** 6 M GdmHCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM DTT (für ATM2 und VIII-B wurde kein Reduktionsmittel eingesetzt)

### 3.3.3 Affinitätschromatographie zur Anreicherung von Proteinen

#### 3.3.3.1 Anreicherung MBP-fusionierter PI4P 5-Kinasen

Um rekombinant erzeugte PI4P 5-Kinasen von *E. coli*-Proteinen zu trennen und anzureichern, wurden die Lysate (3.3.1.2) chromatographisch aufgereinigt. Die Chromatographie erfolgte mit der ÄKTA™ FPLC (GE Healthcare, München, Deutschland), wobei die Absorption bei 280 nm kontinuierlich gemessen wurde. Eine 5 ml MBPTrap HP mit Dextrin Sepharose™ (GE Healthcare, München, Deutschland) wurde mit 10 Säulenvolumina Bindepuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min equilibriert und anschließend mithilfe eines 50 ml-Superloops und einer Flussrate von 1 ml/min mit bis zu 40 ml des Lysats beladen. Dabei bindet das fusionierte MBP an das Säulenmaterial. Anschließend wurde mit 2 ml/min die Säule mit etwa 120 ml des Bindepuffers gewaschen, bis die OD<sub>280</sub> zwischen 0 – 5 mAU entsprach. Die gebundenen MBP-Fusionsproteine wurden mit 20 ml eines Elutionspuffer und einer Flussrate von 2 ml/min von der Säule herausgelöst und in 2 - 5 ml Fraktionen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe der SDS-PAGE und durch Immunodetektion analysiert (3.4.1 und 3.4.2).

**MBP-PIP5K2:** **Bindepuffer:** 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,5 (4 °C)

**Elutionspuffer:** wie Bindepuffer + 10 mM Maltose

**MBP-PIP5K6:** **Bindepuffer:** 200 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,5 (4 °C)

**Elutionspuffer:** wie Bindepuffer + 10 mM Maltose

#### 3.3.3.2 Anreicherung Hexa-Histidin-fusionierter Myosine

Das *E. coli*-Lysat mit dem nativen rekombinanten His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub>, bzw. solubilierte Einschlusskörper der rekombinant erzeugten Myosine His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> bzw. His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> haben trotz ihrer vergleichweisen hohen Reinheit einen Anteil an Fremdproteinen aus *E. coli*. Diese sollten mithilfe einer nativen, bzw. denaturierenden Anreicherung mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA entfernt werden. Für diesen Ansatz wird die hohe Affinität

von Histidin-Resten für die Bindung an Metallionen ausgenutzt. In den Myosin-Konstrukten befinden sich sechs aneinander gereihete Histidine, die mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen, die an eine Matrix fixiert sind, koordinative Bindungen eingehen können. Die Chromatographie erfolgte mithilfe einer 5 ml HisTrap™ HP an einer ÄKTA™ FPLC (GE Healthcare, München, Deutschland). Während der Chromatographie wurde kontinuierlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumina Bindepuffer bei einer Flussrate von 2 ml/min equilibriert. Anschließend wurde das Lysat, bzw. das solubilisierete Protein mit 20 mM Imidazol versetzt und mithilfe eines 50 ml-Superloops mit 0,5 ml/min Flussrate auf die Säule geladen. Danach wurde mit 2 ml/min die Säule mit etwa 40 ml des Bindepuffers gewaschen, bis die  $\text{OD}_{280}$  0 – 5 mAU entsprach. Die Elution erfolgte mithilfe eines linearen Gradienten, wobei die Konzentration von 0 mM auf 350 mM Imidazol in 22 Säulenvolumina mit Elutionspuffer erhöht wurde. Das eluierte Protein wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen. Eluierte Fraktionen mit einem hohen Anteil von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> wurden vereinigt und mithilfe einer Größenausschlusschromatographie (3.3.4) weiterverarbeitet. Für die Analyse denaturierter Proteine wurden 20  $\mu\text{l}$  der Proben mithilfe der NaDoc-Fällung (3.3.7) präzipitiert, in 30  $\mu\text{l}$  1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, bei 95 °C und 10 min inkubiert und 15  $\mu\text{l}$  über SDS-PAGE und Immundetektion analysiert (3.4.1 und 3.4.2). Danach wurden einzelne, gewählte Fraktionen vereinigt und renaturiert (3.3.5.1).

**Bindepuffer (ATM2/VIII-B):** 6 M GdmHCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5 (4 °C)

**Bindepuffer (ATM1):** 750 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5 (4 °C)

**Elutionspuffer (ATM2/VIII-B):** 6 M GdmHCl, 20 mM Tris/HCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5 (4°C)

**Elutionspuffer (ATM1):** 750 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5 (4°C)

### 3.3.4 Trennung von Proteinen nach ihrer Größe durch Größenausschlusschromatographie (SEC)

Um die Reinheit von MBP-PIP5K2 bzw. His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> zu erhöhen und Fremdproteine sowie Nukleinsäuren zu entfernen wurde eine Größenausschlusschromatographie

durchgeführt. Durch die verwendete Methode wäre auch eine Trennung eventueller oligomerer Proteine möglich.

Die Chromatographie erfolgte mithilfe der ÄKTA™ FPLC, wobei die Absorption bei 280 nm kontinuierlich gemessen wurde. Für die Chromatographie wurde eine HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 *prep grade*- Säule (GE healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Säule wurde bei 4 °C mit 800 ml SEC-Puffer bei 1 ml/min Flussrate equilibriert. Eluierte Fraktionen aus der Affinitätschromatographie (3.3.3.1 und 3.3.3.2) wurden vereinigt und 13 ml des Ansatzes auf die Säule mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min geladen. Die Trennung erfolgte mit SEC-Puffer als Laufmittel bei 4 °C bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die eluierten Proteine wurden in 3 ml-Fraktionen aufgefangen und mithilfe einer SDS-PAGE und Immunodetektion auf ihre Zusammensetzung geprüft (3.4.1 und 3.4.2).

**SEC-Puffer:** 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,5 (4 °C) (für ATM1 ohne Reduktionsmittel)

### 3.3.5 Renaturierungsstrategien zur Rückfaltung fehlgefalteter Proteine

#### 3.3.5.1 Renaturierung mithilfe von Dialyse

Denaturierte Proteine können unter diversen Bedingungen in ihre native Struktur renaturieren. Eine Möglichkeit hierbei ist die Renaturierung mithilfe einer Dialyse. Dabei werden solubilisierete, denaturierte Proteine von einer Dialysemembran abgegrenzt und in einen Renaturierungspuffer gegeben. Über Diffusion wird das Denaturierungsmittel langsam mit dem Renaturierungspuffer ausgetauscht und die Proteine können sich falten.

Die Renaturierung rekombinant erzeugter ATM2- und VIII-B-Proteine erfolgte mithilfe einer Dialyse in ATM2- bzw. VIII-B-Renaturierungspuffer. Dazu wurde His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> nach der Affinitätschromatographie (3.3.3.2) mit 2 mM DTT oder 2 mM TCEP versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Da das verwendete His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub>-Protein keine intrinsischen Cysteine beinhaltet, wurde auf ein Reduktionsmittel verzichtet.

Erste Renaturierungsversuche von PIP5K2 und PIP5K6 wurden unter anderem auch über eine Dialyse gemacht. Dazu wurden die solubilisierten Proteine (mit 100 mM DTT) 1:10 mit 6 M GdmHCl und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt.

Die Renaturierung erfolgte in 0,5 ml Mikro-Dialysierkapseln QuixSep® (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und einer Dialysemembran mit einem MWCO von 3.500 Da (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc., Ravensburg, Deutschland). Die Kapseln und Membran wurden dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gekocht, um Schwefelverbindungen und Glycerin (zur

Lagerung der Membran) zu entfernen. Für die Renaturierung wurden 500 µl des jeweiligen Solubilisats (3.3.2 und 3.3.3.2) und 500 ml des Renaturierungspuffers verwendet. Die Rückfaltung des Proteins erfolgte im Kühlraum bei 4 °C, rührend über Nacht.

**ATM2-Renaturierungspuffer:** 500 mM NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Bzw. Tris/HCl), pH 6,5 (4 °C)

**VIII-B-Renaturierungspuffer:** 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10 mM MES, 10 mM Natriumacetat, pH 6,5 (4 °C), 2 mM DTT (oder 2 mM TECEP)

**PIP5K2-Renaturierungspuffer I:** 200 (oder 500) mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 6,5, 1 mM DTT

**PIP5K2-Renaturierungspuffer II:** 200 (oder 500) mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT

**PIP5K2-Renaturierungspuffer III:** 200 (oder 500) mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM DTT

**PIP5K6-Renaturierungspuffer I:** 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT

**PIP5K6-Renaturierungspuffer II:** 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT

**PIP5K6-Renaturierungspuffer III:** 1 M L-Arginin, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT

### 3.3.5.2 Renaturierung auf einer Säule gebundener Proteine

Ein weiterer Test für die Rückfaltung von PIP5K2 war die Renaturierung auf einer 1 ml HisTrap™ HP-Säule mithilfe der ÄKTA™ FPLC (GE Healthcare, München, Deutschland) bei 4 °C. Die Säule wurde mit Solubilisierungspuffer mit 10 Säulenvolumina und einer Flussrate von 2 ml/min equilibriert. Es wurden 5 ml des solubilisierten und dialysierten PIP5K2-Proteins (3.3.6) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 20 ml Solubilisierungspuffer eluiert. Die Rückfaltung erfolgte in einem linearen Gradienten mit Renaturierungspuffer für 180 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Innerhalb dieser Zeit wurde die GdmHCl-Konzentration von 6 M auf 0 M reduziert und der vorhandene Puffer mit Renaturierungspuffer ausgetauscht. Proteine wurden anschließend bei gleicher

Flussgeschwindigkeit für eine weitere h in Renaturierungspuffer inkubiert. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten mit Elutionspuffer für 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min, wobei die Imidazolkonzentration kontinuierlich von 0 mM auf 500 mM erhöht wurde. Um die Chromatographie zu verfolgen, wurde die Absorption bei 280 nm kontinuierlich gemessen. Die Proteinproben wurden mithilfe der SDS-PAGE (3.4.1) und durch Immunodetektion (3.4.2) analysiert. Imidazol wurde vor weiterer Verwendung der Proteine mithilfe einer Dialyse entfernt (3.3.6).

**Solubilisierungspuffer:** 4 M GdmHCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5 (4 °C)

**Renaturierungspuffer:** 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5 (4 °C)

**Elutionspuffer:** 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5 (4 °C)

### 3.3.6 Umpuffern mittels Dialyse

Für die Renaturierung der PIP5K2 auf der Säule, musste DTT aus der solubilisierten Proteinlösung (3.3.2) entfernt werden, um die Bindung an der HisTrap™ HP zu gewährleisten. Dazu wurden 5 ml des solubilisierten Proteins gegen 5 l des PIP5K2-denat-Dialysepuffers dialysiert. Hierfür wurde eine Membran mit einem MWCO von 3.500 Da (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc., Ravensburg, Deutschland) verwendet.

Da die Möglichkeit bestand, dass der Oligomerisierungszustand der rekombinant erzeugten Myosine vom pH-Wert abhängig sein könnte, wurden die Myosine His<sub>6</sub>-ATM<sub>2972-1134</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> bei pH 6,5 renaturiert (3.3.5.1) und 500 µl der Proteine in einem 500 ml Puffersystem bei verschiedenen pH-Werten dialysiert.

Beim auf der Säule renaturierten PIP5K2-Protein (3.3.5.2), musste das Imidazol der Elutionsphase entfernt werden, da es einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des Proteins hat. Dazu wurden 500 µl des Eluats in 500 ml PIP5K2-Dialyse-Puffer umgepuffert.

Die Dialyse erfolgte in 0,5 ml Mikro-Dialysierkapseln QuixSep® (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und mit einer Dialysemembran mit einem MWCO von 3.500 Da (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc., Ravensburg, Deutschland). Kapseln und Dialysemembran wurden zuvor (äquivalent zur Renaturierung) dreimal in ddH<sub>2</sub>O gekocht, um Schwefelverbindungen und Glycerin zu entfernen.

<b>Dialysepuffer:</b>	500 mM NaCl, 10 mM MES, 10 mM Natriumacetat, 20 mM Tris, pH 4 – 9 (eingestellt mit HCl oder NaOH) - für Myosin VIII-B wurde zusätzlich 1 mM TCEP hinzugefügt
<b>PIP5K2-denat-Dialysepuffer:</b>	4 M GdmHCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 (4 °C)
<b>PIP5K2-Dialysepuffer:</b>	500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 (4 °C)

### 3.3.7 Proteinfällung mittels NaDoc/TCA

Eine geringe Konzentration an Proteinen in einer Lösung oder GdmHCl, welches mit SDS unlösliche Salze bildet, stellen Herausforderungen bei der SDS-PAGE-Analyse (3.4.1) dar. Mithilfe der NaDoc/TCA-Fällung lassen sich Proteine denaturierend präzipitieren und so anreichern. Dazu wurde die Proteinprobe mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 900 µl aufgefüllt und mit 100 µl einer 1 % (w/v) NaDoc-Lösung versetzt und gemischt. Nach Zugabe von 200 µl 50 % (w/v) TCA und erneutem Mischen wurde die Lösung für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 21.000 x g und RT für 15 min wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 1 ml eiskaltem Aceton gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurde der Überstand verworfen und das Sediment für etwa 30 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde das Präzipitat bei 95 °C für 10 min in 1 x SDS-Probenpuffer gelöst.

## 3.4 Proteinanalytik

### 3.4.1 Trennung von Proteingemischen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinproben und die Trennung nach ihrer Größe, erfolgte mithilfe der SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Für Myosinfragmente wurden 15 %-ige und für PIP 5-Kinasen wurden 10%-ige SDS-Gele verwendet, die in Gelgießvorrichtungen (SE245 Dual Gel Caster, Hoefer™ Scientific Instruments, Holliston, MA, USA) hergestellt wurden. Die chemische Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 13 dargestellt. Für den Liposomen-Sedimentationstest (3.6.2.2) wurden zur optimalen Auflösung vorgefertigte 4 – 20 %ige SDS-

Gradientengele (SERVAGel™ TG PRIME™, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Proteinproben wurden mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C inkubiert und auf das entsprechende Gel beladen. Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer bei 35 mA pro Gel für 40 – 50 min in einer SDS-Gellaufkammer SE250 (Hofer™ Scientific Instruments, Holliston, MA, USA) durchgeführt, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers aus dem Gel diffundiert. Anschließend wurde das Gel entweder für einen *Western blot* (3.4.2) verwendet oder die Proteine wurden mithilfe einer Quick Coomassie® Stain Lösung (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) für 1 – 16 h angefärbt. Als Größenstandards wurden entweder „PageRuler Prestained Protein Ladder“ oder „PageRuler Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet.

**Tabelle 13: Zusammensetzung von SDS-Gelen (für 4 x 8x10cm Gele)**

Bestandteil	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 30 %-Lösung	5 ml	7,5 ml	1,58 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,875 ml	4,375 ml	6 ml
SDS-Sammelgelpuffer	-	-	1,92 ml
SDS-Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	-
10 % SDS	150 µl	150 µl	144 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED	24 µl	24 µl	24 µl

**4x Laemmli-Probenpuffer:** 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 240 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,08 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

**SDS-Sammelgelpuffer:** 0,625 M Tris/HCl pH 6,8

**SDS-Trenngelpuffer:** 1,88 M Tris/HCl pH 8,8

### 3.4.2 Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und Immundetektion

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mithilfe des *Western blots*. Dabei wurden Proteine über eine SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt und dann aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Protan 0,45 NC GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) transferiert. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte zwischen Filterpapier (Whatman, Madistone, USA) in der Mini-PROTEAN® Tetra System Blotting Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit Transfer-Puffer. Es wurde für 75 min eine Spannung von 60 V angelegt. Anschließend wurden die Transfermembranen zur Blockierung freier Antikörper-Bindungsstellen für 30 – 60 min bei RT mit demjenigen Puffer inkubiert, in der schließlich auch der jeweilige Antikörper gelöst wurde (2.2). Die Membran wurde nach dem Blocken zweimal für jeweils 10 min mit TBST und einmal für 10 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper für 1 h bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert und zweimal für jeweils 10 min mit TBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 1 h bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C. Ungebundene Antikörper wurden wie bereits beschrieben abgewaschen. Die Detektion der an die Sekundärantikörper konjugierten alkalischen Phosphatase oder mit Meerrettich-Peroxidase erfolgte über eine Farbreaktion bzw. über Chemilumineszenz-Detektion.

**TBS-Puffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5

**TBST-Puffer:** TBS mit 0,1 % Tween-20

**Transfer-Puffer:** 0,582 % (w/v) Tris, 0,293 % (w/v) Glycin, 0,375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

#### 3.4.2.1 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase (AP)

Die Membran wurde nach erfolgter Inkubation mit dem sekundären Antikörper (mit konjugierter AP) für 10 min mit AP-Puffer gewaschen. Danach wurden 10 ml AP-Puffer mit 35 µl X-Phosphat-Lösung und 45 µl NBT-Lösung gemischt und auf der Membran für 10 – 60 min inkubiert. Die alkalische Phosphatase katalysiert mit dieser Substratmischung eine Reaktion, bei der ein unlöslicher violetter Farbstoff entsteht, der im sichtbaren Bereich detektierbar ist. Die Reaktion wurde nach Zugabe von ddH<sub>2</sub>O abgestoppt.

<b>AP-Puffer:</b>	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5
<b>NBT-Lösung:</b>	75 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid in 70 % (v/v) DMF
<b>X-Phosphat-Lösung:</b>	50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat in DMF

### 3.4.2.2 Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP)

Für die Detektion mit der konjugierten HRP am sekundären Antikörper wurde das Kit „SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion setzt eine Chemilumineszenz frei, die mit dem Fusion Solo S (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) detektiert wurde.

### 3.4.3 Bestimmung von Oligomerisierungsgraden von Proteinen durch analytische Ultrazentrifugation

Mithilfe der analytischen Ultrazentrifugation können Proteine auf ihre Molekülmassen und somit auch auf ihren Oligomerisierungsgrad untersucht werden. Dabei wird eine Proteinlösung einer Zentrifugalkraft ausgesetzt, was die Sedimentation der Moleküle zur Folge hat. Aus der Sedimentationsgeschwindigkeit kann der Sedimentationskoeffizient  $s$  berechnet werden.

$$s = \frac{u}{\omega^2 \cdot r} = \frac{M(1-v \cdot \rho)}{f} \quad (1)$$

- $s$  – Sedimentationskoeffizient
- $u$  – konstante Geschwindigkeit der Zentrifuge
- $\omega$  – Winkelgeschwindigkeit der Zentrifuge
- $r$  – Abstand des Partikels zur Rotationsachse
- $M$  – Molekulargewicht des Partikels
- $v$  – partielles spezifisches Volumen des Partikels
- $\rho$  – Dichte des Partikels
- $f$  – Reibungskraft pro Partikel

In Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten kann dann die apparente Molekülmasse ermittelt werden. Diese kann mithilfe folgender Formel berechnet werden:

$$M = \frac{2 \cdot R \cdot T}{(1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2} * \frac{d(\ln c)}{d(r^2)} \quad (2)$$

- M – Molekulargewicht des Partikels
- R – molare Gaskonstante
- T – Temperatur
- v – partielles spezifisches Volumen des Partikels
- $\rho$  – Dichte des Partikels
- $\omega$  – Winkelgeschwindigkeit der Zentrifuge
- c – Konzentration des Partikels
- r – Abstand des Partikels zur Rotationsachse

Pflanzliche PI4P 5-Kinasen besitzen eine Sequenzregion, die als Dimerisierungsdomäne beschrieben ist (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Experimentell konnte eine Dimerisierung dieser Proteine oder ein Beitrag der Dimerisierungsdomäne zur Di- oder Oligomerisierung bislang nicht gezeigt werden. Mithilfe der analytischen Ultrazentrifugation wurde hier der Oligomerisierungsgrad pflanzlicher PI4P 5-Kinasen untersucht.

Die C-terminalen Bereiche von Myosinen der Klasse VIII konnten bislang nicht untersucht werden. Auch hier existieren Vorhersagen einer möglichen *coiled coil* Struktur. Dies kann mithilfe der analytischen Ultrazentrifugation ebenfalls untersucht werden.

Die Messungen wurden von PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg) in Doppelsektorzellen bei einer Wellenlänge von 230 nm und 40.000 rpm (bzw. 10.000 rpm im Gleichgewicht) für Myosine, bzw. 280 nm und 20.000 rpm für PI4P 5-Kinasen und 20 °C mit entsprechendem Puffer als Referenz durchgeführt. Die Messungen erfolgten in der Analytischen Ultrazentrifuge ProteomeLab TM XL-1 im AUZ Rotor An-50 Ti (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).

#### 3.4.4 Strukturanalyse mittels Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur eines Proteins kann mithilfe von Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) analysiert werden. Dabei wird links- und rechts-zirkulär polarisiertes Licht von optisch aktiven, also chiralen Molekülen absorbiert. Die Peptidbindungen innerhalb eines Proteins absorbieren im Fern-UV-Bereich (180 – 250 nm) je nach Strukturelement links-, bzw. rechtspolarisiertes Licht unterschiedlich stark. Die dadurch resultierende

Elliptizität ergibt in Abhängigkeit von der Wellenlänge strukturtypische Spektren. Für die Vergleichbarkeit verschiedener CD-Spektren erfolgte die Normierung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäure mit folgender Gleichung:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta * M}{10 * d * c * N}$$

$[\Theta]_{MRW}$ -	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure [deg * cm <sup>2</sup> * dm <sup>-1</sup> ]
$\Theta$ -	gemessene Elliptizität [mdeg]
M -	Molekulargewicht [M]
d -	Schichtdicke der Küvette [cm]
c -	Konzentration [mg * ml <sup>-1</sup> ]
N -	Anzahl der Aminosäuren

Renaturierte Myosine der Klasse VIII (His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub>) wurden in verschiedenen Puffern über Nacht bei 4 °C dialysiert (3.3.6) und für 30 min bei 4 °C und 21.000 x g zentrifugiert, um größere Aggregate zu entfernen. Danach wurden die Proteinlösungen für 30 min bei 20 °C inkubiert. Proteinkonzentrationen von 0,3 – 0,5 mg/ml (3.5.1.2) wurden in einer 0,2 mm Küvette (Hellma GmbH, & Co. KG, Müllheim, Deutschland) bei 20 °C in einem J-810 Spektropolarimeter (JASCO Deutschland GmbH, Pfundstadt, Deutschland) vermessen. Dabei wurden 40 – 64 Akkumulationen verwendet und die Proteinspektren um die Puffersignale korrigiert.

### 3.4.5 Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie

Die renaturierten Myosine migrieren in der SDS-PAGE (3.4.1) auf Höhe von Proteinen mit größerer Masse als ihre theoretische Größe. Da in Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen zusätzlich auch schwache Banden bei etwa 70 kDa und 20 kDa zu erkennen waren, wurde mithilfe der Massenspektrometrie überprüft, ob es sich um die richtigen Fusionsproteine handelte und welche Verunreinigungen in den Proben nachzuweisen waren. Dazu wurden nach erfolgter SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (3.4.1) die zu analysierenden Banden ausgeschnitten, die Proteine extrahiert, ein tryptischer Verdau durchgeführt und die Fragmente über LC-MS analysiert. Alle Schritte ab Extraktion wurden von Dr. Matt Fuszard und Dr. Dirk Dobritzsch (Core Facility – Proteomic Mass Spectrometry, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

## 3.5 Konzentrationsbestimmungen verschiedener Biomoleküle

### 3.5.1 UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

Die Konzentration von Substanzen in Lösung kann u.a. durch Photometrie ermittelt werden. Sichtbares Licht (VIS), bzw. UV-Licht kann Elektronen in einem Molekül von einem niedrigen in ein höheres Energieniveau heben. Dieser physikalische Vorgang wird als Absorption bezeichnet. Somit wird die Intensität des eingestrahnten Lichtes durch die sogenannten Chromophore verringert. Je höher die Konzentration des Chromophoren ist, desto geringer wird die Intensität des austretenden Lichtes. Dieser Zusammenhang kann mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz dargestellt werden:

$$A = \lg_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon * c * d \quad (3)$$

A – Absorption

$I_0$  – Intensität des einfallenden Lichtes

I – Intensität des ausfallenden Lichtes

$\varepsilon$  – molarer Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} * cm^{-1}$ ]

c – Konzentration [M]

d – Schichtdicke [cm]

Dabei ist der molare Extinktionskoeffizient eine stoffspezifische Konstante bei einer bestimmten Wellenlänge. Änderungen in der Absorption können beim Lichtdurchtritt durch eine Lösung über ein Photometer bestimmt werden.

#### 3.5.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die aromatischen Nukleobasen von DNA-Molekülen zeigen stoffspezifische Absorptionsmaxima bei ca. 260 nm. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die Konzentration doppelsträngiger DNA-Lösungen zu ermitteln. Die Quantifizierung erfolgte über ein UV/VIS-Nanospektrometer (Nanodrop 2000, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Dabei wurde die Konzentration mittels folgender Formel berechnet:

$$c_{DNA} = A_{260} * 50 \text{ ng}/\mu\text{l} * \text{Verdünnungsfaktor} \quad (4)$$

$c_{DNA}$  – DNA-Konzentration [ng/ $\mu$ l]

$A_{260}$  – Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

Die Signale wurden vor der Berechnung um das entsprechenden Lösungsmittelsignal korrigiert.

### 3.5.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

In Proteinen absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen bei 280 nm. Die proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm ExPasy Protparam (Wilkins et al., 1999) berechnet. Die Konzentration von Proteinlösungen kann photometrisch nur unter der Voraussetzung exakt bestimmt werden, dass es sich um reine Proteinspezies handelt. Daher wurde die Konzentration renaturierten ATM2s (mit einem Extinktionskoeffizienten von  $31970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , bzw.  $1,029 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), bzw. VIII-Bs (mit einem Extinktionskoeffizienten von  $30480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , bzw.  $1,109 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Die Absorption wurde bei ausreichendem Volumen in einer UV-Küvette im UV/Visible Spectrometer Ultrospec 2100 pro (biochrom, Holliston, USA) bestimmt, bei geringem Volumen im Nanodrop (Nanodrop 2000, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

Zusätzlich zur Konzentration der Proteine kann mithilfe eines Spektrums zwischen 240 und 350 nm die Verunreinigung der Proben mit Nukleinsäuren und anderen absorbierenden Stoffen abgeschätzt werden.

### 3.5.2 Konzentrationsbestimmung mittels Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen mit verschiedenen Proteinverunreinigungen kann mithilfe der Bradford-Methode abgeschätzt werden (Bradford, 1976). Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung, bzw. des Puffers mit 990  $\mu\text{l}$  einer 1x Bradford-Reagenz (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Absorption wurde um das Puffersignal korrigiert. Mithilfe einer BSA-Eichgerade konnte dann die Konzentration bestimmt werden.

## 3.6 Methoden zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen

### 3.6.1 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion

#### 3.6.1.1 *Pull-down-Test*

Um eine mögliche Interaktion von ATM2 mit PIP5K2 oder PIP5K6 *in vitro* zu untersuchen, wurde ein *pull-down-Test* durchgeführt. Das Prinzip hierbei ist, ein Köderprotein an eine Matrix zu binden, mit dem Zielprotein zu inkubieren, nicht gebundene Proteine zu waschen und dann das Köderprotein von der Matrix zu eluieren. Bei erfolgreicher Interaktion wird das Zielprotein mit eluiert und kann anhand seiner Markierung durch Immundetektion nachgewiesen werden (3.4.1 und 3.4.2).

Für den *pull-down-Test* wurden 75 µl HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) pro *pull-down-Test* auf eine Säule (Pierce Centrifuge Columns, 0,8 ml, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gegeben, der Lagerpuffer des Materials für 1 min bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert und die Säule danach dreimal mit je 600 µl des Renaturierungspuffers von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> (3.3.5.1) mit 60 mM Imidazol bei gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Pro Ansatz wurden 5 µg des renaturierten His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> in 600 µl Renaturierungspuffer mit 60 mM Imidazol für 1 h bei 4 °C rührend inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung zentrifugiert (bei 200 x g) und fünfmal mit 600 µl Renaturierungspuffer mit 60 mM Imidazol gewaschen. Aufgrund der nicht bestimmbaren Konzentration wurden für den Interaktionstest 300 µl MBP-PIP5K2-Suspension aus der Präparation nach der Größenausschlusschromatographie (3.3.4) mit 300 µl Renaturierungspuffer mit 60 mM Imidazol verwendet. Für MBP-PIP5K6 wurden 750 ng in 600 µl Renaturierungspuffer mit 60 mM Imidazol gemischt. Das rekombinante MBP-PIP5K6 Protein wurde von Johanna Nordmeier (Abt. Pflanzenbiochemie, MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle wurden 750 ng MBP in 600 µl Renaturierungspuffer mit 60 mM Imidazol gemischt. MBP wurde von Larissa Launhardt (Abt. Pflanzenbiochemie, MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration von MBP-PIP5K6 und MBP wurde mithilfe der Bradford-Methode bestimmt (3.5.2). Die Ansätze wurden für 1 h bei 4 °C rührend inkubiert und anschließend zentrifugiert. Danach folgten fünf Waschschrte mit je 600 µl Renaturierungspuffer mit 60 mM Imidazol bei gleichen Zentrifugationsbedingungen. Die Proteine wurden mit 100 µl des Renaturierungspuffers mit 500 mM Imidazol eluiert und mit 4x Laemmli-Ladepuffer versetzt, bei 95 °C für 10 min

inkubiert und über einen immunochemischen Nachweis mit HRP analysiert (3.4.1 und 3.4.2.2).

### 3.6.1.2 Nachweis von Protein-Protein-Interaktion über das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Interaktion zweier Membran-assoziiierter Proteine kann *in vivo* mithilfe des Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems untersucht werden (Johnsson und Varshavsky, 1994). Dazu wurde das DUALmembrane Kit3 (Dualsystems Blotech AG, Zürich, Schweiz) verwendet. Dabei sind Köder- und Beuteprotein an je eine Hälfte eines Ubiquitins fusioniert, wobei an der C-terminalen Ubiquitinhälfte des Köderproteins (Cub) auch der Transkriptionsfaktor LexA-VP16 verbunden ist. Bei Interaktion der beiden Proteine wird das Ubiquitin aus seinen Hälften rekonstituiert und der Transkriptionsfaktor über eine Ubiquitin-abhängige Protease freigesetzt. Dieser bindet im Nucleus der Hefezellen an spezifische Regionen der DNA, wodurch die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *LacZ* aktiviert werden. Der Hefestamm *S. cerevisiae* NMY51 ist nicht in der Lage Histidin selbst zu produzieren, daher ist dieser Stamm nur auf Selektivmedium ohne Histidin lebensfähig, wenn Beute- und Köderprotein interagieren. Um die spontane Rekonstitution des Ubiquitins im Test zu verhindern, wurde in der N-terminalen Hälfte Isoleucin 13 zu Glycin mutiert und so die Affinität der beiden Proteinhälften herabgesetzt. Als Positivkontrolle wurde pAI-*Alg5* verwendet. Dieses Kontrollprotein besitzt in der fusionierten N-terminalen Ubiquitinhälfte die genannte Mutation nicht, wodurch eine eigenständige Vervollständigung des Ubiquitins erfolgen kann. Als Negativkontrolle diente *Alg5*, welches laut Herstellerangaben mit keinem bekannten anderen Protein interagiert und an die mutierte Ubiquitinhälfte fusioniert wurde (pDL-*Alg5*). Die Kontrollen wurden zusätzlich zu den zu testenden Beutekonstrukten mit den Köderkonstrukten in Hefe kotransformiert. Als Köderproteine wurden verschiedene PI4P 5-Kinasen verwendet, die zusätzlich jeweils mit einem N-terminalen OST4-Fragment fusioniert waren. OST4 ist ein ER-Protein und das verwendete OST4-Fragment vermittelt die feste Assoziation der PI4P 5-Kinase-Fusionsproteine an die cytosolische Seite der ER-Membran. Dadurch kann eine natürlichere Umgebung für die membranassoziierten PI4P 5-Kinasen generiert werden.

Nach Kotransformation der entsprechenden Konstrukte in die Hefezellen (3.2.3) wurden 5 Kolonien in jeweils 500 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden 4 µl auf Selektionsplatten SD-LW und SD-LWH getropft (2.1), bei 30 °C inkubiert und das Wachstum nach 7 Tagen dokumentiert.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

### 3.6.2 Untersuchung der Lipid-Protein-Interaktion

#### 3.6.2.1 Lipid-Overlay-Test

Die Interaktion von Proteinen mit Lipiden kann unter anderem mit einem *Lipid-Overlay-Assay* untersucht werden. Bei diesem Test werden unterschiedliche Lipide auf einer Membran immobilisiert und mit einer Proteinlösung inkubiert. Nach einem Waschvorgang können die an die Lipide gebundenen Proteine durch Immundetektion nachgewiesen werden. Für diesen Test wurden vorgefertigte PIP Strips (Echelon Biosciences Inc., MoBiTec, Göttingen, Deutschland) verwendet. Die Membranen wurden für 30 – 60 min in 3 % (w/w) Milchpulver in TBS bei RT blockiert und anschließend dreimal für 10 min mit TBS gewaschen. Für die Interaktion GST-fusionierter lipidbindender Fragmente der Myosine (in pGEX-6P-1, Tabelle 16 im Anhang 0) wurden jeweils 100 µl der Lysate (3.3.1) in 6 ml 3 % (w/v) BSA (fettsäurefrei) in TBS gegeben für 1 h bei RT mit der Lipid-Membran inkubiert. Für renaturierte Myosine wurden 2,5 µg/ml Protein (Endkonzentration) in 3 % (w/v) BSA (fettsäurefrei) in TBS gegeben und für 45 min bei RT mit der Lipid-Membran inkubiert. Danach folgten jeweils zwei Waschschrte mit TBS für 10 min und ein Waschschrte mit TBST für 10 min. An Lipiden gebundene Proteine wurden mithilfe von Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurde die gleiche Prozedur wie in 3.4.2 beschrieben angewendet. Die Detektion erfolgte jeweils über die alkalische Phosphatase (3.4.2.1).

**TBS-Puffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5

**TBST-Puffer:** TBS mit 0,1 % Tween-20

#### 3.6.2.2 Liposomen-Sedimentationstest

Eine weitere Möglichkeit die Interaktion von Proteinen an Lipiden zu untersuchen ist der Liposomen-Sedimentationstest (Julkowska et al., 2013). Bei diesem Test werden die Lipide in Gemischen aus Struktur- (Träger-)lipiden und bindenden Lipiden in Form von extrudierten Liposomen angeboten, was dem physiologischen *in vivo* Zustand etwas näher kommt als das konzentrierte Angebot individueller Lipide im *Lipid-Overlay-Assay*. Die Liposomen können durch Extrusion in ihrer Größe variiert werden und sind mit einer dichten Pufferlösung gefüllt, die ihre Sedimentation erlaubt. Lösliche Proteine, die an die Liposomen binden, können durch Zentrifugation aus der Lösung sedimentiert und im Niederschlag als lipidbindende Proteine nachgewiesen werden. Für den Liposomen-Sedimentationstest wurden Liposomen mit 180 nmol des Strukturlipids PC mit je 20 nmol von PI4P, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PS oder PI hergestellt. Zur Kontrolle dienten Liposomen, die aus 200 nmol PC produziert wurden. Die

Lipide wurden gemischt und in 2 ml LoBind Eppendorfgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) unter Luftstrom getrocknet, in 500 µl Extrusionspuffer resuspendiert und für 1,5 h bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 30 s im Ultraschallbad inkubiert. Die Lösungen wurden 13-mal über eine Polycarbonatmembran (0,2 µm Porengröße) mit Filterhilfen (Avanti Polar Lipids Inc., Alabama, USA) unter Einsatz eines Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids Inc., Alabama, USA) zu Liposomen extrudiert. Dazu wurde das 1,5x Volumen an 1x Bindepuffer hinzugegeben und das Gemisch für 15 min bei 21.000 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Liposomen in 25 µl 1x Bindepuffer resuspendiert. Für die Interaktion mit Liposomen wurden 20,8 µl der Proteinlösung mit 4,2 µl 6x Bindepuffer gemischt. Für renaturiertes ATM2-Protein wurde eine Endkonzentration von 10 ng/µl und für renaturiertes VIII-B-Protein von 20 ng/µl mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt. Die Proteinlösungen wurden für 10 min bei 16.000 x g und RT zentrifugiert, um aggregierte Proteine zu entfernen. Der Überstand wurde zur 25 µl-Liposomensuspension gegeben und für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 16.000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 16,7 µl 4x Laemmli-Ladepuffer (3.4.1) gemischt und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Sedimente wurden in 500 µl 1x Bindepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Liposomen in 33 µl 1x Laemmli-Ladepuffer resuspendiert und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Zur Kontrolle wurden 25 µl der vorbereiteten Proteinlösung mit 8,4 µl 4x Laemmli-Ladepuffer gemischt, bei 95 °C für 10 min denaturiert. Für die Auswertung wurden 10 µl der Sedimente und Überstände, bzw. 5 µl der Proteinlösungen mithilfe der SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt und über einen immunochemischen Nachweis (3.4.2) analysiert.

**Extrusionspuffer:** 250 mM Raffinose, 25 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, pH 7,5

**1x Bindepuffer:** 125 mM KCl, 25 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, pH 7,5

### 3.6.3 Bestimmung der PI4P 5-Kinase-Aktivität

Um die Aktivität der PI4P 5-Kinasen zu untersuchen, den Erfolg der Renaturierung zu prüfen, bzw. den Einfluss von Myosinen der Klasse VIII auf die Lipid-Kinase-Aktivität der untersuchten PI4P 5-Kinasen zu analysieren, wurde ein *in vitro* Aktivitätstest durchgeführt. Bei diesem Aktivitätstest wird die katalysierte Phosphorylierung des Substrates PI4P zu PI(4,5)P<sub>2</sub> in Anwesenheit von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt, so dass die Übertragung des  $\gamma$ -

Phosphatrestes zur Bildung von [<sup>32</sup>P]-markierten PI(4,5)P<sub>2</sub>s führt. Die radiomarkierten Lipide werden anschließend sauer extrahiert, dünnschichtchromatographisch separiert und die Radiomarkierung über einen Phosphorimager quantifiziert. Der radioaktive Test wurde im Radioisotopenlabor durchgeführt (Biozentrum). Zunächst wurden pro Reaktion 6,2 µg PI4P unter Luftstrom eingedampft, in 5 µl 2 % Triton X-100 gelöst und für 10 min im eiskaltem Ultraschallbad inkubiert. Die entstandenen Substratvesikel wurden im 20 µl-Reaktionsansatz mit 37,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2,5 mM ATP, 5 – 10 µCi γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) und 3 mM Tris/HCl (pH 7,2) komplettiert. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 30 µl einer Protein-Lösung gestartet. In dieser Lösung wurden entweder 1 µg einer PI4P 5-Kinase mit entsprechendem Puffer eingesetzt, bzw. 5 µl eines *E. coli* Lysats. Für die Herstellung eines *E. coli*-Lysats ohne induzierte Proteinproduktion wurde der untransformierte Stamm wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben angezogen und 1 ml der Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 1 ml MBP-PIP6-Aufschlusspuffer (3.3.1) resuspendiert, mittels Ultraschalls aufgeschlossen (3.3.1.1) und anschließend für 30 min bei 4 °C und 21.000 x g zentrifugiert. Für den Aktivitätstest wurden 5 µl des Überstandes eingesetzt. Für die renaturierten PI4P 5-Kinasen konnte aufgrund der geringen Mengen, keine Konzentrationen ermittelt werden, daher wurden für verschiedene Bedingungen jeweils 10 – 30 µl der Proteinlösung verwendet. Für den Einfluss von Myosinen auf die Lipid-Kinase-Aktivität wurden zusätzlich zur PI4P 5-Kinase 5 mM DTT und 5 µg von ATM2 oder VIII-B, bzw. Lysozym als Negativkontrolle eingesetzt, für 1 h bei RT inkubiert und danach die Reaktion in Glasröhrchen gestartet. Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,5 ml Chloroform:Methanol (1:2 (v/v)) abgestoppt. Die Extraktion der Phospholipide erfolgte mit der Zugabe von 500 µl 2,4 M HCl, 250 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und 500 µl Chloroform. Der Ansatz wurde gemischt und die untere organische Phase in ein neues Glasröhrchen transferiert. Die obere Phase wurde mit 500 µl Chloroform reextrahiert und die untere Phase entnommen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 750 µl 0,5 M HCl in H<sub>2</sub>O:Methanol (1:1 (v/v)) gewaschen, die untere Phase in ein neues Glasröhrchen überführt und im Luftstrom getrocknet. Die Trennung der Lipide erfolgte mithilfe einer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten Si-60 (20 x 20 cm, Merck, Darmstadt, Deutschland). Dazu wurden die Proben in 20 µl Chloroform gelöst, auf die Platte aufgetragen und getrocknet. Es wurde Chloroform:Methanol:Ammoniumhydroxid:H<sub>2</sub>O (45:45:4:11 (v/v/v/v)) als Laufmittel verwendet (Perera et al., 2005). Die Chromatographie wurde nach 45 min beendet und die Platten getrocknet. Die Detektion von Lipiden mit

radioaktiv markierten Phosphaten erfolgte durch Exposition von Imager-Platten (BAS-IP-MS 2040 E, Cytiva, Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) über Nacht. Die Platten wurden dann mithilfe des Phosphorimagers Typhoon gelesen und mit ImageQuant TL (Cytiva Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) quantifiziert.

### **3.6.3.1 Statistische Auswertung des Aktivitätstests**

Für die Darstellung der statistischen Werte wurden Balkendiagramme mit den entsprechenden Mittelwerten generiert und die Standardabweichungen als Fehlerbalken eingefügt. Dazu wurde Microsoft Office 365 Excel verwendet (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Mit dem online Tool „Statistics Kingdom“ wurde überprüft, basierend auf den Shapiro-Wilk Test, ob die generierten Daten statistisch normal verteilt vorliegen (November 2017, Melbourne, Australien). Die Signifikanzen wurden mittels T-Tests mit Microsoft Office 365 Excel generiert (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

## 4 Ergebnisse

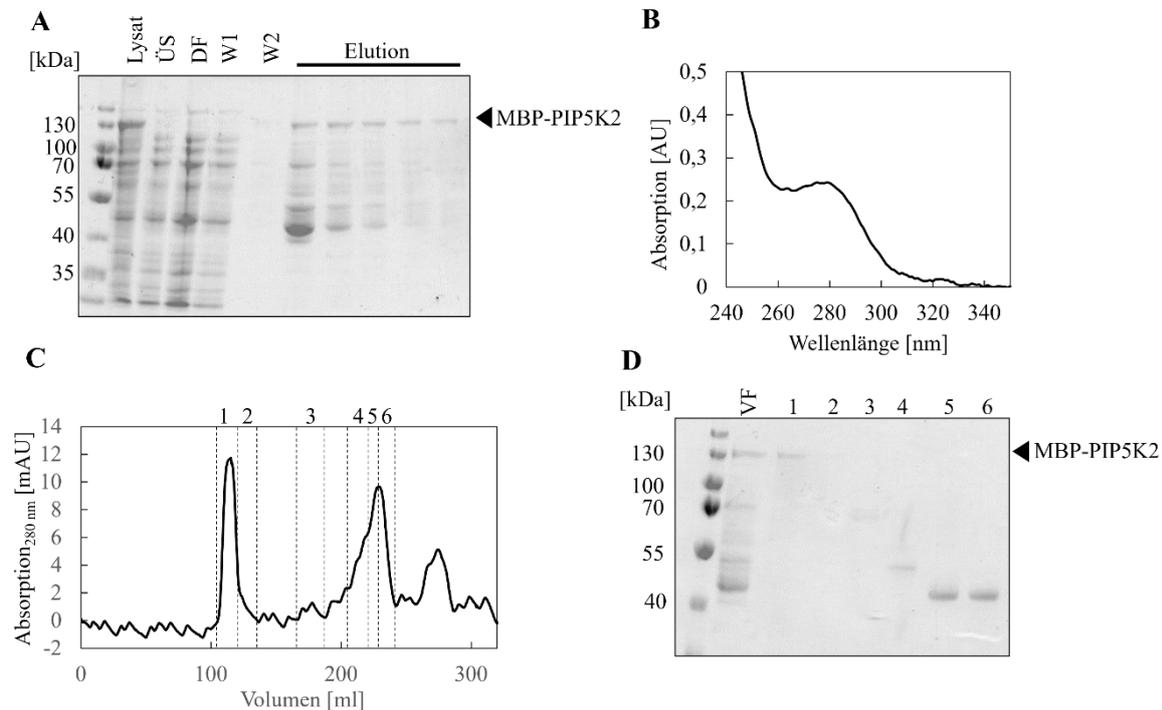
### 4.1 Kapitel I: Biochemische Charakterisierung von PI4P 5-Kinasen

Zu Beginn der Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass PI4P 5-Kinasen aufgrund posttranslationaler Modifikationen eine strukturelle Veränderung erfahren können und ihre Funktion somit reguliert werden kann (Hempel et al., 2017). Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst durch strukturelle Informationen von PI4P 5-Kinasen ein besseres Verständnis u.a. von Regulationsmechanismen zu erhalten. Hierzu war vorgesehen, *Crosslinking*-Reaktionen mit anschließender Massenspektrometrie, Circular dichroismus-Spektren und andere Methoden zur Analyse der Struktur von Proteinen durchzuführen. Da für diese Experimente reine und homogene Proteinpräparationen notwendig sind und diese Voraussetzung sich in der Vergangenheit als limitierend erwiesen hatte, befasste sich der erste Teil der Arbeit daher mit der Optimierung der Anreicherung und Analyse verschiedener rekombinanter PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana*. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den Isoformen PIP5K2 und PIP5K6.

#### 4.1.1 Native Reinigungsstrategien von PIP5K2 und PIP5K6

In vorherigen Experimenten der Abteilung Pflanzenbiochemie wurde beobachtet, dass die heterologe Expression von PI4P 5-Kinasen in *E. coli*, Proteine mit nur begrenzter Löslichkeit in verschiedenen wässrigen Puffern ergab. Bisher wurden PI4P 5-Kinasen daher als Fusionen mit bestimmten Proteinen wie bspw. dem Maltosebindenden Protein (MBP) exprimiert, um die Löslichkeit in *E. coli* und die nachfolgende Reinigung der PI4P 5-Kinasen zu verbessern (bspw. (Stenzel et al., 2008; Ischebeck et al., 2011; Stenzel et al., 2012)). Die N-terminale Fusion mit MBP führte in den genannten Studien zu einem löslichen Protein, während andere Fusionen bspw. mit GST übermäßige unlösliche Aggregate in *E. coli* zur Folge hatten. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, native MBP-fusionierte PIP5K2- und PIP5K6-Proteine für weitere Analysen anzureichern und über das zuvor erreichte Maß aufzureinigen. Proteine werden hier als nativ beschrieben, wenn sie eine korrekte Faltung besitzen und zusätzlich auch mit anderen Proteinfragmenten fusioniert sein können. Die korrekte Faltung wurde aufgrund von enzymatischer Aktivität angenommen. Dazu wurden die Konstrukte (Tabelle 16) jeweils rekombinant in *E. coli* exprimiert (3.2.4) und anschließend zunächst über

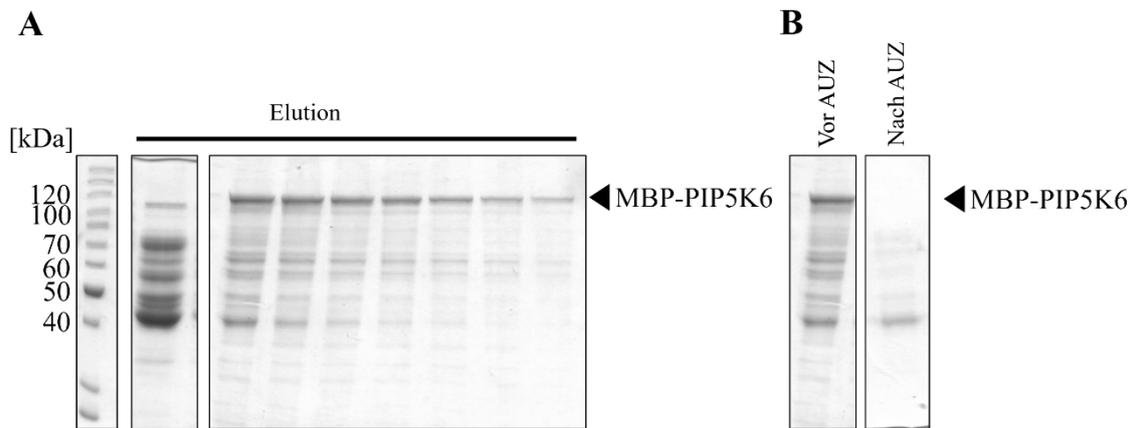
eine Affinitätschromatographie an einer Amylose-Matrix angereichert (3.3.3.1). Die Anreicherung und deren Analyse ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Analyse verschiedener Proben der PIP5K2-Anreicherung.** **A)** Verschiedene Proben der PIP5K2-Anreicherung wurden im SDS-PAGE-Gel (10 % Acrylamid) auf ihre Proteinzusammensetzung analysiert. Lysat – Aufgeschlossene Zellen in Suspension, ÜS – Überstand nach Zentrifugation des Lysates, DF – Durchfluss, W1 – Waschfraktion 1, W2 – Waschfraktion 2. Die restlichen Spuren waren Fraktionen der Elution. Das SDS-PAGE-Gel wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. Das Zielprotein MBP-PIP5K2 hat ein Molekulargewicht von 129 kDa. **B)** UV/VIS-Absorptionsspektrum der vereinigten Elutionsfraktionen aus der Anreicherung. Das Spektrum wurde um das Puffer-Signal bei RT korrigiert. **C)** Präparative Größenausschlusschromatographie der vereinigten Elutionsfraktion (13 ml). Die Proteine wurden nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Ausschlussvolumen von 120 ml eluierten Aggregate, während Moleküle mit Größen zwischen 10 kDa – 600 kDa später eluierten. Die Zahlen über dem Chromatogramm repräsentieren die Fraktionen, die in der SDS-PAGE analysiert wurden. **D)** Proteinproben aus der SEC wurden mithilfe einer SDS-PAGE analysiert (10 % Acrylamid). Dabei wurden 15 µl VF – Vereinigte Fraktion aus der Elution der MBPTrap als Kontrolle aufgetragen. Spur 1 – 6 sind jeweils 15 µl der Proben aus den Fraktionen der SEC (C). Das SDS-PAGE-Gel wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. N = 1

Die Anreicherung von MBP-PIP5K2 über MBPTrap HP wurde mithilfe der ÄKTA™ FPLC chromatographisch verfolgt (Abbildung 28A im Anhang). Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mit einer SDS-PAGE (3.4.1) analysiert wie in Abbildung 9A zu sehen ist. Das Lysat enthielt direkt nach dem Aufschluss noch einen großen Teil des Zielproteins, während nach der Zentrifugation im Überstand nur eine sehr schwache Bande auf Höhe von etwa 130 kDa zu erkennen ist. Trotz der löslichkeitsvermittelnden MBP-Fusion aggregierte das Zielprotein substantiell und war in der unlöslichen Fraktion zu finden (hier nicht gezeigt). Nachdem die löslichen Proteine aus dem Überstand an der MBPTrap HP banden, wurden andere Fremdproteine von der Säule gewaschen, bis kein Protein in der Waschfraktion detektiert wurde (Abbildung 9A, Waschfraktion W2). Die Fraktionen der

Elution zeigten diverse Banden von etwa 40 kDa bis 130 kDa. Das Zielprotein mit einer Masse von 129 kDa war als klare Bande beim Marker auf Höhe von 130 kDa zu erkennen und konnte im Vergleich zum Überstand nach dem Zellaufschluss angereichert werden. Spätere Elutionsfraktionen besaßen weniger Verunreinigungen durch Proteine im Verhältnis zum MBP-PIP5K2 (Abbildung 9A, Vergleich der Elutionsfraktionen). Es sollte mithilfe von Absorptionsspektroskopie das Vorhandensein von Nukleinsäuren untersucht werden. Dazu wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und spektroskopisch analysiert. Aus Abbildung 9B wird ersichtlich, dass ein für Proteine typisches Maximum bei 280 nm existiert. Während reine Proteinlösungen ein zusätzlich ausgeprägtes Minimum bei etwa 250 nm aufweisen, war in der analysierten Lösung ein plateauähnlicher Verlauf zwischen 280 nm und 260 nm zu erkennen. Dies deutet auf das Vorhandensein von Nukleinsäuren in der Präparation hin, welche ein typisches Absorptionsmaximum bei etwa 260 nm haben. Das heißt, dass trotz DNase I-Verdau und dem ersten Anreicherungsschritt noch Nukleinsäuren in der Proteinlösung vorhanden gewesen sein könnten. Im Bereich von 350 nm bis 300 nm war ein leichter Anstieg der Absorption zu sehen, der auf Lichtstreuung zurückzuführen ist (Abbildung 9B). Diese könnten eine Folge der Aggregation von Proteinen in der Lösung sein. Um Verunreinigungen und Aggregate zu entfernen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (3.3.4). Das Chromatogramm ist in Abbildung 9C dargestellt. Es sind drei Hauptspitzen zu erkennen. Die erste befindet sich zwischen 105 ml und 125 ml. Es handelt sich hierbei um das Ausschlussvolumen, bei dem Moleküle eluieren, die größer sind als die Trennleistung der Säule hergibt ( $M > 600$  kDa), also aggregierte Proteine. Die zweite Absorptionsspitze befindet sich zwischen 200 ml und 240 ml. In diesem Bereich eluieren laut Herstellerangaben Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa bis 70 kDa. Die letzte Spitze befindet sich zwischen 260 ml und 280 ml der Elution, wo kleine absorbierende Moleküle eluieren. Die Analyse der einzelnen Fraktionen wurde mithilfe der SDS-PAGE (3.4.1) durchgeführt. Die Zahlen über dem Chromatogramm in Abbildung 9C repräsentieren die analysierten Fraktionen. Das SDS-PAGE-Gel ist in Abbildung 9D dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich im Ausschlussvolumen MBP-PIP5K2 in reiner Form befand im Vergleich zur Elutionsfraktion der MBPTrap HP. Daraus kann geschlossen werden, dass MBP-PIP5K2 in aggregierter Form vorlag. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration, die im Gelbild (Abbildung 9D) abzuschätzen ist, waren weitere Analysen nicht möglich. Im Vergleich zu MBP-PIP5K2 wurde MBP-PIP5K6 nur über eine MBPTrap HP angereichert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 28B im Anhang gezeigt, die SDS-PAGE-Analyse der Anreicherung ist in Abbildung 10 zu sehen.



**Abbildung 10: SDS-PAGE-Gele aus der Anreicherung von MBP-PIP5K6 und Analyse mithilfe der AUZ.** Nach dem Zellaufschluss wurde der lösliche Überstand über eine 5 ml MBPTrap HP gegeben. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 mM auf 10 mM Maltose in 30 Säulenvolumina. Die Fraktionen der Elution wurden in der SDS-PAGE analysiert. **A)** Es wurden 15 µl aus verschiedenen Proben der Elution im SDS-PAGE-Gel (10 % Acrylamid) auf ihre Proteinzusammensetzung analysiert. Das SDS-PAGE-Gel wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. Das Zielprotein MBP-PIP5K6 hat ein Molekulargewicht von 123 kDa. **B)** Die zweite Elutionsfraktion der MBPTrap HP wurde mithilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) analysiert. Die Messung erfolgte für 24 h bei 20 °C und 10.000 rpm. Anschließend wurden 15 µl der Probe mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. N = 1

Die Chromatogramme beider Proteine waren ähnlich und die analysierten Elutionsfraktionen der beiden Proteinpräparationen zeigten nach der SDS-PAGE hohe Anteile von niedermolekularen Verunreinigungen (Vergleich Abbildung 9A und Abbildung 10A). Mengenmäßig enthielt die Präparation mit MBP-PIP5K6 mehr angereichertes Protein. Trotz der Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen wurde eine analytische Ultrazentrifugation (AUZ) durchgeführt (3.4.3). Dabei sollte herausgefunden werden, ob sich MBP-PIP5K6 als monomeres Protein oder als vorhergesagtes Dimer (Müller Röber & Pical, 2002) in der Lösung befand. Die Zentrifugalkraft wurde so angepasst, dass Proteine im geeigneten Massebereich analysierbar sedimentierten. Innerhalb kurzer Zeit sedimentierten 50 % der Proteine als inhomogene Aggregate. Die restlichen 50 % waren bei dieser Drehzahl nur schwer auswertbar. Nach der Messung wurde die Probe auf ihre Proteinzusammensetzung über eine SDS-PAGE überprüft. In Abbildung 10B ist zu erkennen, dass nach der AUZ kein Vollängenprotein mehr nachweisbar war. Stattdessen wurde eine starke Proteinbande auf Höhe von etwa 40 kDa beobachtet. Weitere schwache Proteinbanden waren im Bereich von 40 kDa bis 70 kDa erkennbar. Es ist anzunehmen, dass MBP-PIP5K6 als inhomogenes Aggregat sedimentierte, während andere Verunreinigungen löslich vorlagen und in der SDS-PAGE detektiert wurden.

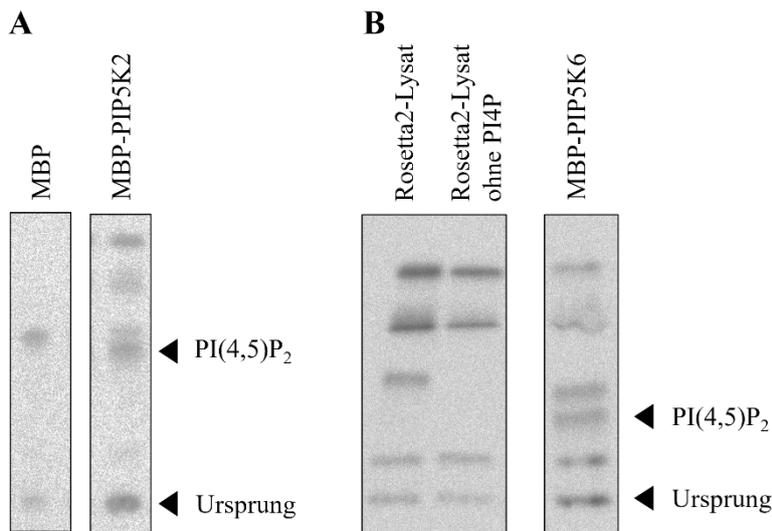
Aus den Anreicherungsversuchen von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6 wird ersichtlich, dass trotz einer gewissen Löslichkeit durch die Fusion mit MBP, die Proteine nach wie vor zur

Aggregation neigen. Dadurch war mit den vorhandenen Präparationen keine strukturelle Analyse möglich.

#### **4.1.2 Rekombinant exprimierte PI4P 5-Kinasen sind trotz ihrer aggregierten Form enzymatisch aktiv**

Die Gründe für die Tendenz von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6, inhomogene Aggregate zu bilden sind unklar. Es handelt sich um membranassoziierte Proteine, daher ist denkbar, dass bei der Anreicherung auch assoziierte Lipide mitgeführt werden, die mglw. die Aggregation der Proteine fördern. Auch Nukleinsäure-Verunreinigungen waren in den Proteinlösungen vorhanden (4.1.1 Abbildung 9B). Es ist also denkbar, dass die apparenten hohen Massen auf verschiedenartige assoziierte Verunreinigungen zurückzuführen sind und nicht auf eine Fehlfaltung und anschließende Aggregation der entfalteten Proteine. Ein Hinweis auf die korrekte Faltung eines Enzyms ist seine katalytische Aktivität. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die aggregierten MBP-PIP5K2- oder MBP-PIP5K6-Proteine enzymatisch aktiv sind. Zu diesem Zweck wurde ein PI4P 5-Kinase-Aktivitätstest durchgeführt (3.6.3).

Aus Abbildung 11A (links) wird ersichtlich, dass in der Negativkontrolle mit MBP zwei Banden zu erkennen sind. Die Untere ist dabei die Auftragungsbande und die obere Bande ist ein unspezifisches Signal, da MBP keine bekannte enzymatische Aktivität besitzt. Im Gegensatz dazu sind in den PI4P 5-Kinase-Proben zusätzliche Banden identifiziert worden. Unter der unspezifischen Bande ist sowohl für MBP-PIP5K2 (Abbildung 11A, rechts) und MBP-PIP5K6 (Abbildung 11B, rechts) ein weiteres Signal zu sehen, dass in keiner Negativkontrolle auftaucht. Dabei muss es sich um das Produkt PI(4,5)P<sub>2</sub> handeln.



**Abbildung 11: Dünnschichtchromatographie der Aktivitätstests von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6.** Für den Aktivitätstest wurden 20  $\mu$ l der Vesikel-Lösung mit 30  $\mu$ l Proteinlösung und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Lipide sauer extrahiert und über eine Dünnschicht chromatographisch aufgetrennt. **A)** Aufgrund der geringen Konzentration wurden 15  $\mu$ l der MBP-PIP5K2-Lösung (aus der SEC) verwendet und mit 15  $\mu$ l SEC-Puffer verdünnt. Für die Negativkontrolle wurde 1  $\mu$ g MBP verwendet (zur Verfügung gestellt von Larissa Launhardt). N = 3, n = 6 **B)** Es wurden 5  $\mu$ l des *E. coli*-Lysats mit 25  $\mu$ l MBP-PIP5K6-Auflösungspuffer versetzt und als Negativkontrolle verwendet, links mit dem Substrat PI4P (in 5  $\mu$ l 2 % Triton X-100), rechts ohne Substrat (mit 5  $\mu$ l 2 % Triton X-100). N = 1, n = 2. Für MBP-PIP5K6 wurde aus einer Elutionsfraktion 1  $\mu$ g eingesetzt. Die Konzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. N = 3, n = 6

Daraus kann geschlossen werden, dass die Proteine trotz ihres aggregierten Erscheinungsbildes (4.1.1) enzymatisch aktiv sind. Direkt über der unspezifischen Bande wurden zwei weitere Signale detektiert. Im Vergleich zu Abbildung 11B, links, wo *E. coli* Lysat als Negativkontrolle fungierte, ist zu sehen, dass sich auch dort zwei Banden über der unspezifischen Bande befanden. Daraus kann geschlossen werden, dass Proteine aus *E. coli* in der Lage sind Lipide zu phosphorylieren, welche dann mit extrahiert und über eine Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden können. Es handelt sich um *E. coli*-eigene Lipide, da in Abwesenheit von PI4P ebenfalls beide Banden entstehen (Abbildung 11B, Mitte). Zusätzlich kann auch noch geschlossen werden, dass sich in den angereicherten Proteinproben zusätzlich *E. coli*-eigene Lipide und Proteine befinden müssen, die ebenfalls in den Lysat-Negativkontrollen vorhanden waren aufgrund der detektierten Banden in der Dünnschichtchromatographie.

Da die rekombinanten Fusionsproteine katalytisch aktiv waren, können die apparenten Aggregationen von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6 nicht auf völliger Fehlfaltung beruhen. Jedoch muss eingeräumt werden, dass sich in den Proteinlösungen diverse Verunreinigungen befinden wie Lipide, Proteine und Nukleinsäuren. Es könnte sich dabei um eine partikuläre Assoziation diverser Substanzen an PI4P 5-Kinasen handeln, die weitere Analysen einschränken.

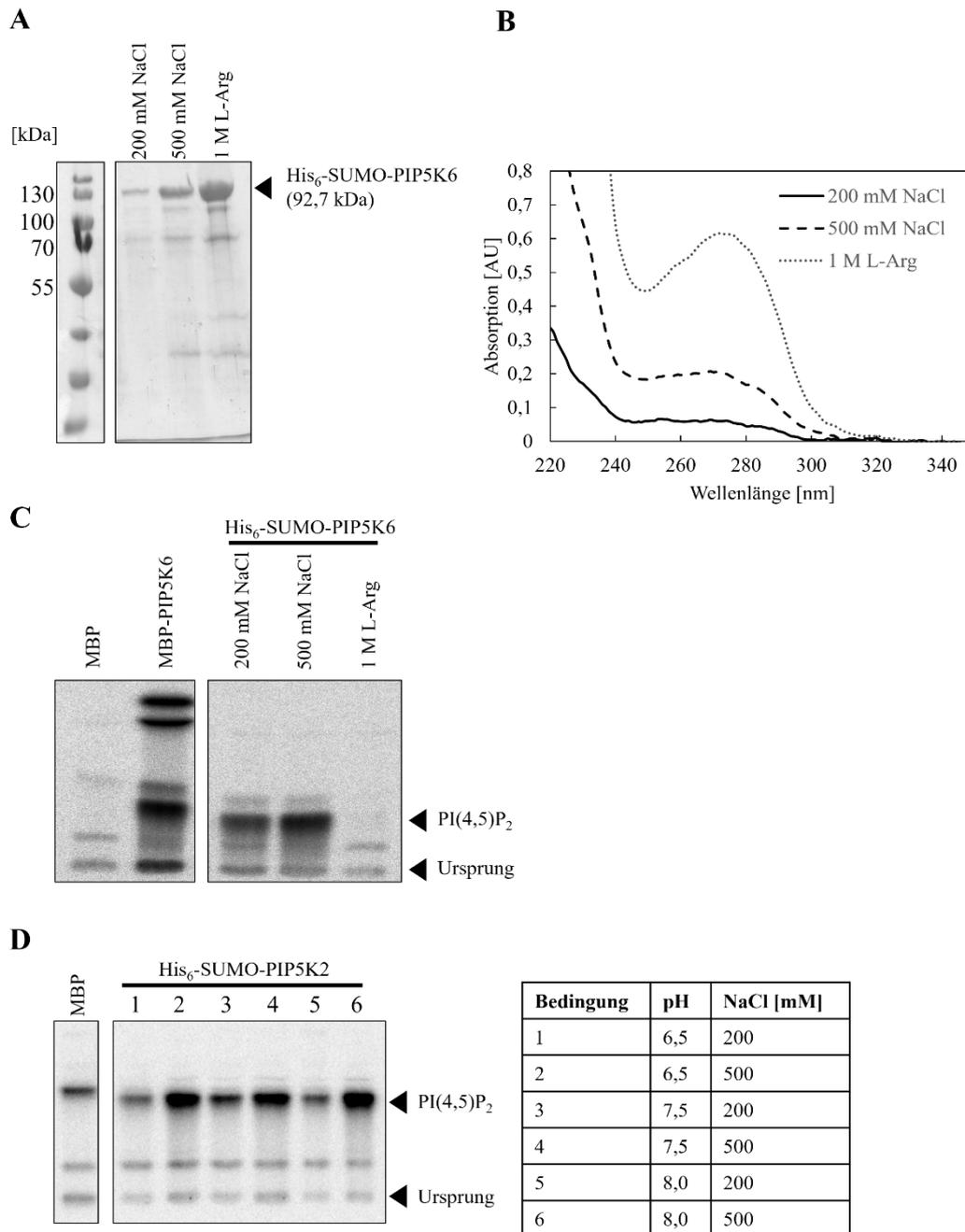
Um die Reinheit von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6 zu erhöhen, den Aggregationsgrad zu vermindern und die Proteine gleichzeitig zu stabilisieren, sollten die Proteine daher unter denaturierenden Bedingungen von ihren Verunreinigungen getrennt und im nächsten Schritt wieder renaturierenden Bedingungen ausgesetzt werden.

#### 4.1.3 Denaturierung und Renaturierung von PIP5K2 und PIP5K6

Die Solubilisierung von Einschlusskörpern und deren nachfolgende Renaturierung wird eingesetzt, wenn z. B. Disulfidbrücken in einem Protein vorkommen, die im Zytosol von *E. coli* nicht, bzw. im Periplasma in zu geringen Mengen gebildet werden. Die Prozedur kann aber auch angewendet werden, wenn die native Reinigung in sehr geringen Maßen funktioniert, bzw. der größte Teil des rekombinant exprimierten Proteins im Sediment aufgrund von Aggregation vorkommt. Bekannterweise neigen die pflanzlichen PI4P 5-Kinasen im prokaryotischen Expressionssystem zur Aggregation (siehe 4.1.1), weshalb sie dadurch einen idealen Kandidaten für Renaturierungsversuche darstellen.

Zu diesem Zweck wurden PIP5K2 und PIP5K6 in den Champion pETSumo adapt Vektor kloniert, sodass eine N-terminale His<sub>6</sub>-SUMO-Fusion vorlag (Tabelle 16). Die Konstrukte wurden in *E. coli* Rosetta2 (DE3) transformiert und wie beschrieben angezogen (3.2.4). Ziel der Genexpression war es, so viel unlösliches Protein wie möglich zu erhalten. Anschließend wurden die aggregierten Proteine in Form einer Einschlusskörper-Isolation aus der Zellsuspension extrahiert (3.3.2). Diese wurden dann in 6 M GdmHCl denaturierend solubilisiert. Für die Renaturierung eines Proteins müssen optimale Bedingungen über systematisches Testen gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten erste Versuche für die Renaturierung der PI4P 5-Kinasen durchgeführt werden. Dabei wurden die gelösten Proteine gegen den jeweiligen Renaturierungspuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand analysiert (3.3.5.1). Die Ergebnisse der Analyse der renaturierten His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 und His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 sind in Abbildung 12 dargestellt. Zunächst wurden die Überstände mittels SDS-PAGE untersucht. Wie in Abbildung 12 A zu erkennen ist, konnte jeder hier untersuchte Renaturierungspuffer zu löslicher His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 führen. Um die Mengen renaturierter Vollängenproteine abzuschätzen, wurde mithilfe des Programms ImageQuant TL (Cytiva Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) das Signal der Coomassie-gefärbten Bande bestimmt und mit den anderen Bedingungen verglichen. Dabei konnte ermittelt werden, dass etwa 3,5-mal so viel Protein bei 500 mM NaCl (Abbildung 12A, mittlere Spur) gegenüber 200 mM NaCl (Abbildung 12A, linke Spur) renaturiert werden konnte, wobei auch zusätzliche weitere

Banden stärker zu erkennen sind. Bei der Renaturierung mit 1 M L-Arginin (Abbildung 12A, rechts) wurde etwa 6-mal mehr Protein löslich im Vergleich zur Renaturierung mit 200 mM NaCl. Auch hier waren weitere Proteinbanden zu sehen. Mithilfe der Absorptionsspektroskopie sollte abgeschätzt werden ob noch Nukleinsäure-Verunreinigungen zu erkennen waren. Aus Abbildung 12B wird deutlich, dass mit der Renaturierung in 200 mM bzw. 500 mM NaCl kein typisches Proteinspektrum gemessen werden konnte. Es war kein ausgeprägtes Maximum bei 280 nm, bzw. ein Minimum bei 250 nm zu erkennen. Das deutet auf vorliegende Nukleinsäure-Verunreinigung hin. Die Proteinprobe, die mit 1 M L-Arginin dialysiert wurde, wies ein ausgeprägteres Absorptionsmaximum auf, jedoch nicht wie erwartet bei 280 nm. Im Bereich zwischen 320 nm und 300 nm war ein leichter Absorptionsanstieg zu erkennen, was auf eventuelle Lichtstreu-Effekte zurückzuführen ist, die durch Oligomere hervorgerufen werden können, die das Absorptionsmaximum verschieben können.



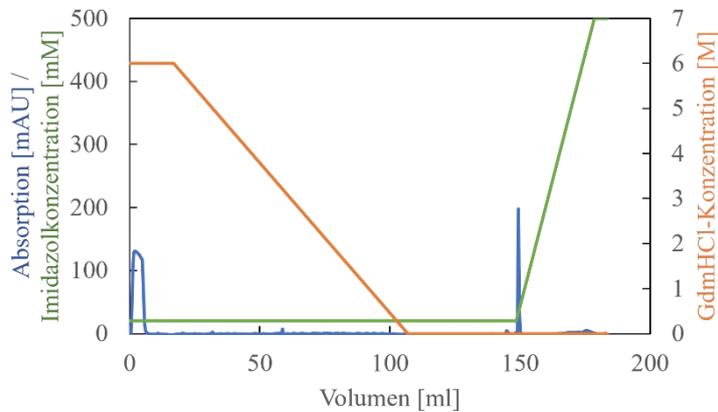
**Abbildung 12: Renaturierung von PIP5K2 und PIP5K6 mittels Dialyse.** Der isolierte Einschlusskörper mit His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6, bzw. His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 wurde wie beschrieben in Lösung gebracht und 1:10 mit Solubilisierungspuffer verdünnt. Anschließend erfolgte die Renaturierung in verschiedenen Puffern mittels Dialyse. **A)** Die Renaturierungen von His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 erfolgten in 3 verschiedenen Puffern: 1. 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 2. 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 3. 1 M L-Arginin, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM DTT. Zu sehen ist ein SDS-PAGE-Gel (10 % Acrylamid). Aufgetragen wurden jeweils 15 µl der Überstände der zentrifugierten renaturierten Proteinproben. Spur 1 – 3 sind jeweils 15 µl der Überstände der Proben in den jeweiligen Renaturierungspuffern. His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 hat eine Masse von 92,7 kDa. N = 1 **B)** UV/Vis-Spektren der renaturierten Proteine. Die Spektren wurden um das jeweilige Renaturierungspuffer-Signal bei RT korrigiert. N = 1 **C)** Aktivitätstest der Proteinproben. Für MBP (Negativkontrolle) wurde 1 µg in 30 µl MBP-PIP5K6-Auflösungspuffer gelöst. Für MBP-PIP5K6 (Positivkontrolle) wurde 1 µg in MBP-PIP5K6-Auflösungspuffer gelöst. Die Konzentration wurde mit der Bradfordmethode bestimmt. Für die Aktivitätstests der renaturierten Proteine wurden jeweils 30 µl eingesetzt. N = 1. **D)** Aktivitätstest der renaturierten His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2-Proteine (links). Die Renaturierung erfolgte in verschiedenen Pufferbedingungen (rechts) mit jeweils 20 mM Tris/HCl und zusätzlich 1 mM DTT. Es konnten keine Absorptionsspektren gemessen werden, bzw. Banden in einem SDS-PAGE-Gel detektiert werden. Daher wurden pro Reaktion jeweils 30 µl der renaturierten Proteine eingesetzt. N = 1

Um die Funktionalität der renaturierten Proteine zu überprüfen und damit den Erfolg der Renaturierung, wurde wieder ein Aktivitätstest durchgeführt (3.6.3), wobei MBP als Negativkontrolle und MBP-PIP5K6 als Positivkontrolle verwendet wurden (Abbildung 12C). Es wurden jeweils 30 µl der renaturierten Proteine eingesetzt. Es ist eine Produktbande bei den Proteinproben zu sehen, die mit 200 mM NaCl, bzw. 500 mM NaCl renaturiert wurden, was auf eine erfolgreiche Renaturierung deutet, während die His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6, die mit 1 M L-Arginin renaturiert wurde, keine Produktbande aufwies. Gründe für dieses Phänomen werden später diskutiert (5.2). Weiterhin war zu beobachten, dass die beiden oberen Banden, die in der Positivkontrolle zu erkennen sind, bei den Spuren der renaturierten Proteine nicht erschienen.

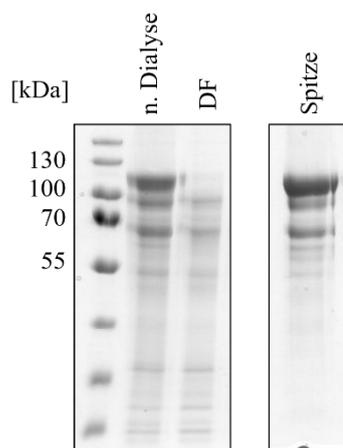
His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 wurde ebenfalls mithilfe von Dialyse gegen verschiedene Puffer renaturiert (3.3.5.1). Dabei wurden pH-Werte (6,5; 7,5; 8,0) und NaCl-Konzentrationen (200 mM und 500 mM) variiert. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Abbildung 12D rechts zu erkennen. Nachdem die solubilisierten Proteine über Nacht gegen Renaturierungspuffer dialysiert und anschließend zentrifugiert wurden, konnten keine Proteine im SDS-PAGE-Gel, bzw. in der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie detektiert werden. Es wurden trotzdem jeweils 30 µl der Proteinlösungen für einen Aktivitätstest (3.6.3) verwendet. In Abbildung 12D links ist zu erkennen, dass in der Negativkontrolle mit MBP eine Bande zu sehen ist. Dabei handelte es sich um eine unspezifische Bande. Im Vergleich dazu war bei allen renaturierten Proben eine Bande zu erkennen, die niedriger als die unspezifische Bande detektierbar ist, welche PI(4,5)P<sub>2</sub> zugeordnet wurde. Die Intensitäten der einzelnen Produktbanden schwankten. Bei den Renaturierungen mit 500 mM NaCl war eine höhere Intensität zu erkennen im Vergleich zu den Renaturierungen mit 200 mM NaCl. Es lässt sich abschätzen, dass der pH-Wert keinen signifikanten Einfluss auf die Renaturierung hatte. Auch hier war ein Erfolg der Renaturierung zu verzeichnen, obwohl die Konzentration der Proteine für weitere Analysen zu gering war. Da jedoch für His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 keine weiteren Analysen durchgeführt werden konnten, wurde als weitere Renaturierungsstrategie versucht, das Protein denaturiert auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA zu binden und auf der Säule zu renaturieren (3.3.5.2). Dazu wurde das solubilierte Protein gegen 4 M GdmHCl und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 (4 °C) dialysiert, um DTT weitestgehend so zu verdünnen, dass keine Reduktion des Säulenmaterials und damit eine Bindung des Proteins erfolgen kann. Anschließend wurde mithilfe eines Gradienten die Konzentration an GdmHCl verringert und mit Renaturierungspuffer langsam ausgetauscht. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von Imidazol. Die Renaturierung auf einer Säule hat den Vorteil, dass Aggregation verhindert

wird, solange sich das Protein auf der Säule befindet, da die intermolekularen Wechselwirkungen aufgrund der koordinativen Bindung an das Säulenmaterial unterbunden werden können.

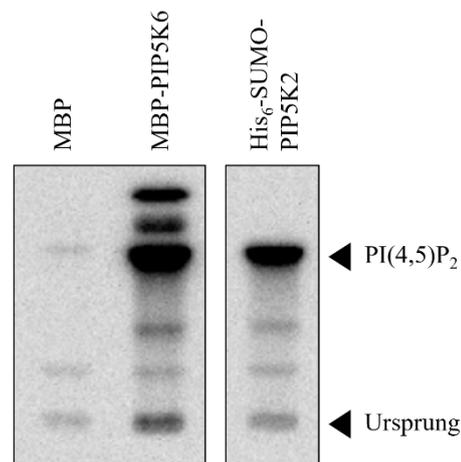
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 13: Renaturierung von His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix.** Es wurden 5 ml der solubilisierten His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 gegen 5 l des PIP5K2-denat-Dialysepuffers dialysiert, sodass DTT verdünnt wurde. Anschließend wurde das Protein denaturierend auf eine 1 ml HisTrap™ HP beladen. **A)** Zu sehen ist das Chromatogramm der Renaturierung auf der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix. Die Absorption wurde kontinuierlich bei 280 nm gemessen. Nach Beladen der Säule wurde mithilfe eines linearen Gradienten für 180 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min die Konzentration von GdmHCl von 6 M auf 0 M reduziert und mit Renaturierungspuffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5) ausgetauscht. Danach wurde der Renaturierungspuffer bei gleicher Flussrate für 60 min über die Säule gegeben. Die Elution erfolgte für 30 min bei einem linearen Gradienten bei einer Flussrate von 1 ml/min von 0 mM auf 500 mM Imidazol. Durchfluss (von 0 ml – 5 ml Volumen, DF) und die Spitze bei etwa 150 ml wurden in einer SDS-PAGE analysiert. N = 1. **B)** Dargestellt ist ein SDS-PAGE-Gel (10 % Acrylamid). Es wurden jeweils 15 µl Proben aus der Chromatographie (A) entnommen und analysiert. Es wurde GdmHCl aus 15 µl der Probe nach der Dialyse (n. Dialyse) und 15 µl des Durchflusses (DF) mittels NaDoc/TCA-Fällung entfernt und auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Das SDS-PAGE-Gel wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. N = 1. **C)** Das eluierte Protein wurde gegen Renaturierungspuffer ohne Imidazol dialysiert und ein PI4P 5-Kinase-Aktivitätstest durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde 1 µg MBP in 30 µl MBP-PIP5K6-Aufschlusspuffer gelöst. Als Positivkontrolle wurde 1 µg von MBP-PIP5K6 in 30 µl MBP-PIP5K6-Ausschlusspuffer gelöst. Die Konzentrationen wurden mit der Bradford-Methode bestimmt. Zum Testen des Renaturierungserfolges wurden 30 µl der dialysierten His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 verwendet. N = 1

In Abbildung 13A ist das Chromatogramm der beschriebenen Renaturierungsstrategie dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich ein gewisser Teil absorbierender Substanzen im Durchfluss befindet. Es handelt sich dabei vermutlich um Proteine und Nukleinsäuren. Die Elution des an der Säule gebundenen Proteins erfolgte bereits bei geringen Mengen an Imidazol in einer sehr scharfen Spitze. Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Proben wurde mittels SDS-PAGE (3.4.1) analysiert. Da GdmHCl mit SDS unlösliche Salze bildet, wurde dieses mithilfe der NaDOC/TCA-Fällung entfernt (3.3.7). Es ist in Abbildung 13B zu erkennen, dass ein Großteil des His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2-Proteins an die Säule gebunden wurde, da im Durchfluss kaum Volllängenprotein, stattdessen einige kleinere Proteinverunreinigungen detektiert wurden. Das eluierte Protein zeigte einen großen Teil an His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2, aber auch weitere geringe Verunreinigungen. Der Erfolg der Renaturierung sollte wieder mit einem Aktivitätstest überprüft werden. Da aufgrund des Imidazols die Aktivität der PI4P 5-Kinase beeinflusst werden könnte, wurde dieses durch eine Dialyse entfernt (3.3.6). Nachdem die Proteinprobe zentrifugiert wurde, wurde im Überstand kaum Protein im UV/Vis-Spektrum detektiert. Eventuell aggregierte ein Großteil über Nacht. Trotzdem wurde ein Aktivitätstest durchgeführt (Abbildung 13C). Im Vergleich zur Negativkontrolle war die unspezifische Bande auf sehr ähnlicher Höhe wie die Produktbande der Positivkontrolle, aber mit wesentlich schwächerer Intensität. Die zu analysierende Probe zeigte ebenfalls eine deutlich höhere Intensität im Vergleich zur Negativkontrolle, was die PI4P 5-Kinase-Aktivität bestätigt. Weiterhin ist zu erkennen, dass die obersten Banden, die in der Positivkontrolle zu sehen sind, bei der Probe mit dem renaturierten Protein nicht zu sehen sind.

Insgesamt hat die Renaturierung von His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K2 und His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 aktive Proteine ergeben, deren geringe Konzentration jedoch keine weiteren Analysen zuließ.

Weiterhin ist nach wie vor nicht ersichtlich, woher das Aggregationsverhalten pflanzlicher PI4P 5-Kinasen kommt und wieso die aggregierten Proteine dennoch katalytisch aktiv sind.

## **4.2 Kapitel II: Interaktion von PI4P 5-Kinasen mit Myosinen der Klasse VIII**

Neben der Untersuchung grundlegender struktureller Eigenschaften pflanzlicher PI4P 5-Kinasen war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen inwiefern Interaktionspartner die Funktion dieser Enzyme beeinflussen können. Hierbei sollte speziell die Rolle der als regulatorisch beschriebenen N-terminalen Proteindomänen von PI4P 5-

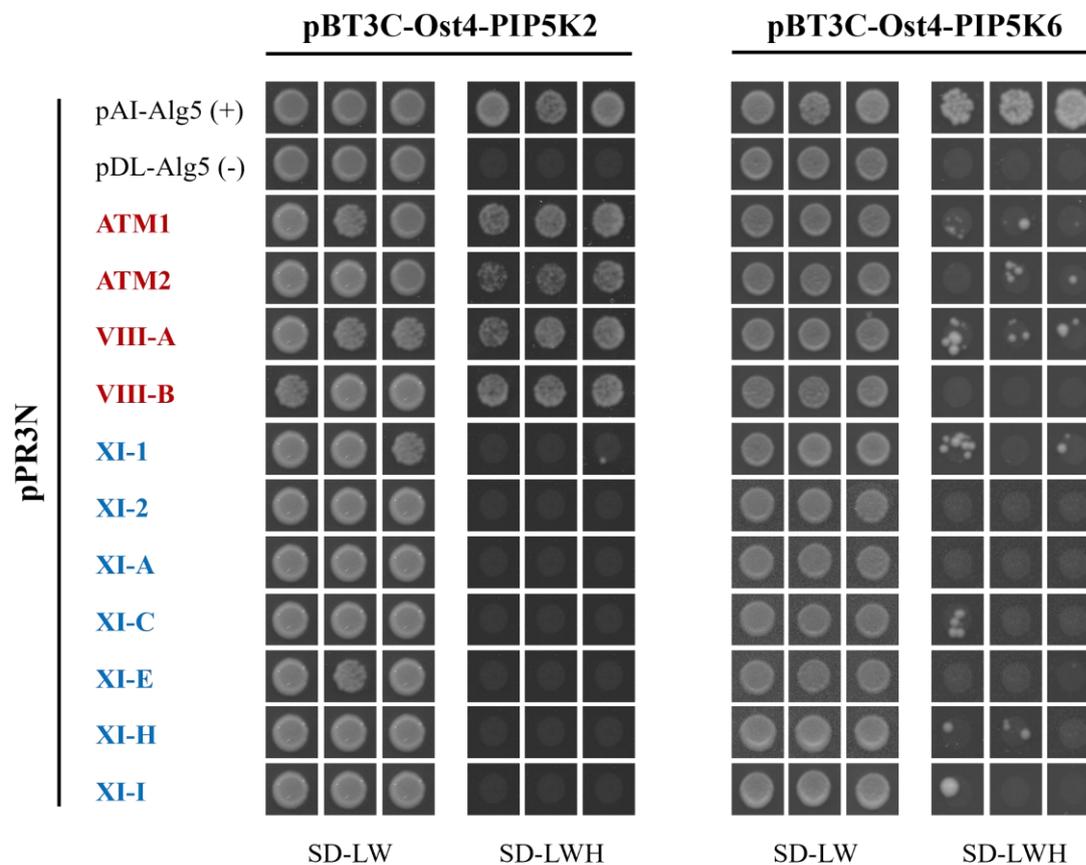
Kinasen der Subfamilie B betrachtet werden, die die enigmatische MORN-Repeat-Region umfasst. Im Vergleich zu pflanzlichen PI4P 5-Kinasen ist bei den entsprechenden Enzymen aus tierischen Systemen kein N-terminaler Bereich mit MORN- und Linker-Domäne vorhanden. Strukturanalysen für PI4P 5-Kinasen liegen nur für Enzyme aus tierischen Organismen vor (Burden et al., 1999; Hu et al., 2015), wo die Erzeugung reiner und löslicher Proteine erfolgreich war. Das führte zur Annahme, dass die Neigung pflanzlicher PI4P 5-Kinasen zur Aggregation mglw. über den pflanzenspezifischen N-terminalen Bereich vermittelt werden könnte, einschließlich der MORN-Domäne.

Die physiologische Funktion der MORN-Motiv-Wiederholungen ist bislang nicht geklärt und Experimente in diesem Abschnitt hatten zum Ziel, die Rolle der MORN-Region besser zu verstehen, um ggf. auch auf ihren Einfluss auf Struktur und Aggregation der PI4P 5-Kinasen schließen zu können. Im Jahr 2019 zeigten Li und Kollegen die Struktur eines Proteinkomplexes aus einem MORN-Protein aus Maus während seiner Interaktion mit einem Fragment eines humanen Myosins der Klasse III (Li et al., 2019). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde hier die Hypothese formuliert, dass auch die MORN-Domänen pflanzlicher PI4P 5-Kinasen eine Rolle in der Interaktion mit Myosinen haben könnten. Da eine solche Interaktion bislang nicht beschrieben war, wurde die Hypothese zunächst systematisch getestet.

#### **4.2.1 Interaktionsstudien von PIP5K2 und PIP5K6 mit verschiedenen Myosinen aus *A. thaliana***

In *A. thaliana* existieren vier Arten von Myosinen der Klasse VIII und 13 Arten von Myosinen der Klasse XI und beide Myosin-Klassen unterscheiden sich grundlegend in ihrer Primärstruktur von menschlichen Myosinen der Klasse III. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob pflanzliche Myosine mit PI4P 5-Kinasen interagieren. Dazu wurden verschiedene Vertreter der Myosinklassen VIII und XI für Interaktionsstudien gewählt und Split-Ubiquitin-basierte Hefe-Zwei-Hybridstudien mit den C-terminalen Myosin-Bereichen (ohne Motor- und IQ-Domäne) gegen PIP5K2 oder PIP5K6 durchgeführt (3.6.1.2). Diese beiden PI4P 5-Kinasen wurden ausgewählt, weil aus Vorarbeiten bekannt ist, dass PIP5K2 einen starken Einfluss auf die Aktindynamik hat, PIP5K6 aber nicht (Stenzel et al., 2012; Fratini et al., 2021). Für die Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente wurden die Myosinfragmente als Beute und die PI4P 5-Kinasen als Köder verwendet (Tabelle 17). Die Ergebnisse des Interaktionstests sind in Abbildung 14 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass bei den Positivkontrollen sowohl

auf SD-LW- und SD-LWH-Platten Wachstum zu sehen war. Bei den Negativkontrollen war auf SD-LWH-Platten kein Wachstum zu erkennen, was eine zufällige Assoziation der Beuteproteine mit PIP5K2, bzw. PIP5K6 ausschließt.



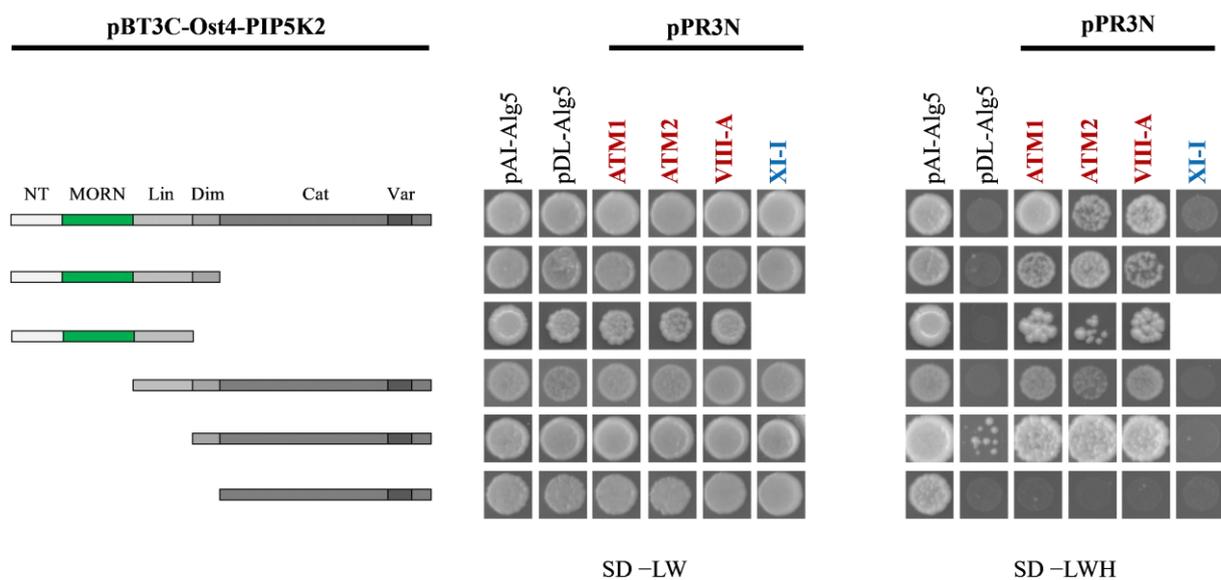
**Abbildung 14: Hefe-Zwei-Hybrid-Studien von PIP5K2 und PIP5K6 als Köder mit diversen Myosinen aus *A. thaliana* als Beute.** Es wurde die Interaktion von PIP5K2 und PIP5K6 im pBT3C-Ost4-Vektor als Köderprotein mit verschiedenen C-termini von Myosinen im pPR3N-Vektor als Beuteprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. Dabei diente pAI-Alg5 als Positivkontrolle und pDL-Alg5 als Negativkontrolle. Myosine der Klasse VIII sind rot und ausgewählte Myosine der Klasse XI sind blau dargestellt. Das Experiment wurde 2-3-mal mit jeweils 3–5 Klonen durchgeführt, u.a. auch von Lisa Freitag im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (2020) mit jeweils 3 repräsentativen Kolonien. Es wurden jeweils 4 µl der Hefezellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf zwei Selektionsmedien kultiviert. Hefezellsuspensionen wurden auf SD-LW ausplattiert, um kotransformierte Hefezellen zu selektieren und ein einheitliches Wachstum der Zellproben zu kontrollieren. Die Selektion auf SD-LWH zeigt die Interaktion der zu testenden Proteine an. Die Platten wurden für 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Tropftests zur Interaktion von PIP5K2 mit den Myosinen der Klasse VIII zeigten alle ein deutliches Wachstum auf Selektivmedium, was für eine Interaktion der Kinase mit Klasse VIII-Myosinen spricht. Bei den Tests zur Interaktion von PIP5K2 mit den Myosinen der Klasse XI war dagegen kein Wachstum auf Selektivmedium zu verzeichnen, was darauf deutet, dass keine Interaktion stattfand. Bei den Tests zur Interaktion von PIP5K6 war bei keiner Myosin-Isoform der Klassen VIII oder XI ein eindeutiges Wachstum auf Selektivmedium zu beobachten. Es waren vereinzelte Kolonien sowohl bei Klasse VIII- als auch bei Klasse XI-Myosinen zu sehen. Aufgrund des uneinheitlichen Wachstums und dem

deutlichen Unterschied zur Positivkontrolle wurden diese jedoch nicht als Interaktion interpretiert.

Es wurden zusätzlich auch andere PI4P 5-Kinasen der Subfamilie B (PIP5K1 und PIP5K9) und die PI4P 5-Kinasen der Subfamilie A (PIP5K10 und PIP5K11) auf Interaktion mit ausgewählten Myosinen aus *A. thaliana* (C-Termini) getestet (siehe Anhang Abbildung 30). Dabei war zu beobachten, dass PIP5K1 sich ähnlich verhielt wie PIP5K2 und ebenso eine Interaktion mit den Myosinen der Klasse VIII zeigte. Dagegen zeigte PIP5K9 ein ähnliches Muster wie PIP5K6. PIP5K10 zeigte ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis, während PIP5K11 mit den Myosinen der Klasse VIII zu interagieren schien, nicht aber mit Klasse XI-Myosinen. Da PI4P 5-Kinasen der Subfamilie A keine MORN-Domäne besitzen, stellte sich die Frage, ob dieses spezielle Aminosäuremotiv tatsächlich für eine mögliche Interaktion notwendig sei, wie zunächst hypothetisiert wurde.

Da die Hefe-Zwei-Hybrid-Studien mit der PIP5K2 eindeutige Ergebnisse lieferten, wurden für die Identifizierung der möglichen Interaktionsregionen von PIP5K2 mit den C-terminalen Bereichen der Myosine der Klasse VIII weitere Hefe-Zwei-Hybrid-Tests durchgeführt. Dazu wurden als Köderproteine verkürzte Varianten von PIP5K2 (Tabelle 17) mit verschiedenen Myosinen als Beuteproteine in Hefe kotransformiert und erneut auf Selektionsmedien ausplattiert. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Tests dargestellt. Volllängen-PIP5K2 wurde als zusätzliche Positivkontrolle verwendet (Abbildung 15, 1. Konstrukt).



**Abbildung 15:** Hefe-Zwei-Hybrid-Studien mit trunkierten Varianten von PIP5K2 mit C-Termini ausgewählter Myosine. Es wurde die Interaktion von trunkierten Varianten von PIP5K2 im pBT3C-Ost4-Vektor als Köderprotein mit den C-termini von ausgewählten Myosinen im pPR3N-Vektor als Beuteprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. NT – N-Terminus (AS 1 - 79), MORN – *membrane occupation and recognition nexus*-Domäne (AS 80 – 259), Lin – Linkerdomäne (AS 260 – 343), Dim – Dimerisierungsdomäne (AS 344 –

409), Cat – katalytische Domäne (AS 410 – 754), Var – Variables Insert. pAI-Alg5 diente als Positivkontrolle und pDL-Alg5 als Negativkontrolle. Myosine der Klasse VIII sind rot und ausgewählte Myosine der Klasse XI sind blau geschrieben. Die Tropfstests wurden 1-3-mal wiederholt mit jeweils 2 – 5 Kolonien. Hier wurde jeweils eine repräsentative Kolonie pro Interaktionstest dargestellt. Es wurden jeweils 4 µl der Hefezellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf zwei Selektionsmedien kultiviert. Hefezellsuspensionen wurden auf SD-LW ausplattiert, um kotransformierte Hefezellen zu selektieren und ein einheitliches Wachstum der Zellproben zu kontrollieren. Die Selektion auf SD-LWH zeigt die Interaktion der zu testenden Proteine an. Die Platten wurden für 5 - 7 Tage bei 30 °C inkubiert.

Es wurde eine Variante erzeugt, in der die katalytische Domäne fehlt (Abbildung 15, 2. Konstrukt). Hier war ein Wachstum von Hefekolonien zu sehen. Ebenso wurde der komplette N-terminale Bereich ohne katalytische Domäne und Dimerisierungsdomäne getestet (Abbildung 15, 3. Konstrukt), wobei auch eine Interaktion stattzufinden schien. Varianten der PIP5K2, die aus katalytischer Domäne und Dimerisierungsdomäne bestehen (Abbildung 15, 5. Konstrukt), bzw. auch zusätzlich aus der Linkerdomäne (Abbildung 15, 4. Konstrukt) führten auch zu einem Wachstum auf Selektionsmedium im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Lediglich die katalytische Domäne allein (Abbildung 15, 6. Konstrukt) führte zu keinem Wachstum und deutete so auf keine funktionierende Interaktion mit den Myosinen der Klasse VIII hin. Es gibt keine Domäne, die allein eine Interaktionsstelle darstellt. Daher ist es denkbar, dass der Bereich von der Linkerregion und der Dimerisierungsdomäne die Interaktion zu Myosinen der Klasse VIII vermittelt. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde das Myosin XI-I, als Vertreter der Klasse XI, verwendet. Hier ist bei keiner PI4P 5-Kinase-Variante Wachstum zu erkennen.

Obwohl eine MORN-Myosin-Interaktion dem Test auf Interaktion von PI4P 5-Kinasen und pflanzlichen Myosinen zugrunde lag, zeigten die Interaktionsstudien mit den verkürzten Varianten von PIP5K2 keine Beteiligung der MORN-Region an der Interaktion der PI4P 5-Kinase mit Myosinen der Klasse VIII an. Da aber unklar bleibt, ob die verwendeten PI4P 5-Kinase-Fragmente sich als Teilproteine korrekt falten können oder ob sie in den Hefezellen jeweils ausreichend stark exprimiert werden, ist eine schlüssige Auswertung zur Region der Interaktion der Partnerproteine anhand der vorliegenden Hefe-Zwei-Hybrid-Daten nicht möglich.

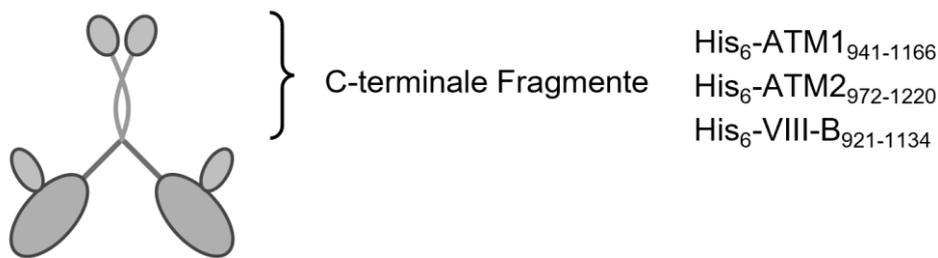
Die Hefe-Zwei-Hybrid-Studien zeigten dennoch eine interessante Interaktion von Myosinen der Klasse VIII mit PI4P 5-Kinasen, speziell mit PIP5K2. Diese Interaktion sollte mit einem weiteren Test verifiziert werden. Dazu sollten ausgewählte Myosine rekombinant exprimiert und für *pull-down*-Tests verwendet werden. Bisher wurden die C-terminalen Fragmente pflanzlicher Myosine der Klasse VIII nicht rekombinant in löslicher Form produziert. Dies liegt u.a. an der Neigung rekombinanter Myosine zur Aggregation und an ihrer Anfälligkeit

für Proteolyse. Es war daher eine Herausforderung dieser Arbeit, Vertreter dieser Proteinklasse nativ anzureichern.

#### 4.2.2 Native Anreicherung des C-Terminus von Myosin ATM1

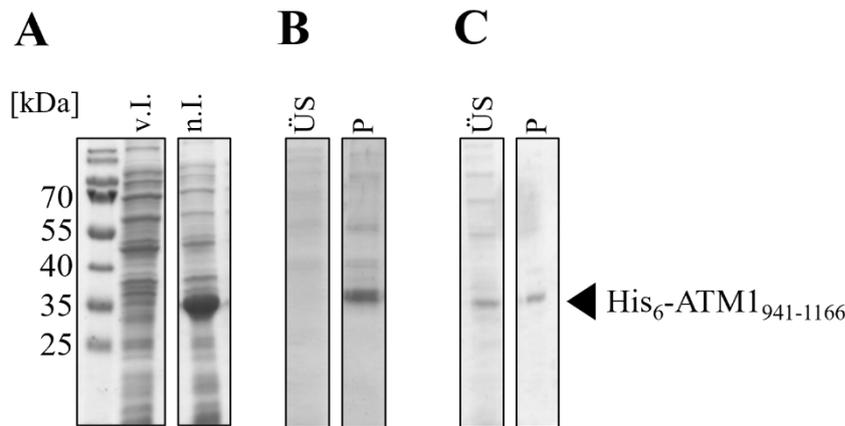
Beim Grundaufbau der Myosine ist der C-Terminus im Allgemeinen der Bereich, in dem Interaktionen mit Cargo-Molekülen stattfinden, so dass diese durch die N-terminale Motordomäne entlang von Zytoskelettsträngen transportiert werden können. Weiterhin konnten auch strukturelle Motive identifiziert werden, die in anderen Proteinen bspw. enzymatische Aktivitäten zeigten (Mermall et al., 1998). Die Funktionen solcher Sequenzmotive sind in Myosinen divers, weitestgehend unverstanden und definieren die Myosine in ihre verschiedenen Klassen. Myosine der Klasse VIII kommen ausschließlich in Pflanzen vor und ihre molekulare Funktion ist kaum untersucht. Eine allgemeine Struktur der Klasse VIII-Myosine (dimere Form) ist in Abbildung 16 (links) dargestellt.

##### Klasse VIII-Myosine



**Abbildung 16: Allgemeine Struktur der Klasse VIII-Myosine und verwendete Fragmente.** Cartoon-Darstellung der Myosinklasse VIII als Dimer. Der markierte Bereich repräsentiert die verwendeten C-terminalen Fragmente. Diese wurden mit einer N-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung fusioniert (His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub>, His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub>). Das Bild wurde modifiziert nach Kastner et al., 2022.

In dieser Arbeit wurde erstmals der C-Terminus der Myosine ATM1, ATM2 und VIII-B aus *A. thaliana* rekombinant hergestellt und sollte für weitere Charakterisierungen angereichert werden (Tabelle 16). Die verwendeten Fragmente sind in Abbildung 16 (rechts) aufgeführt. Zunächst wurden Expressions- und Löslichkeitsanalysen mit Myosin His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> durchgeführt (3.2.4 und 3.3.1.1). Um abzuschätzen, in welchen Mengen das Myosin heterolog in *E. coli* exprimiert wurde, wurden die Zellen 4 h nach der Induktion mithilfe einer SDS-PAGE (3.4.1) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 präsentiert.

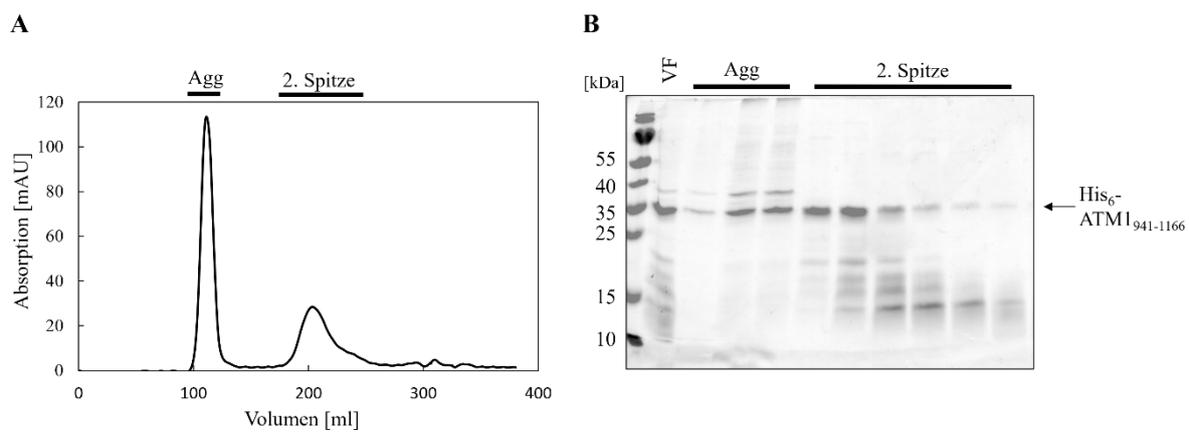


**Abbildung 17: SDS-PAGE-Gele (15 % Acrylamid) von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub>-Produktion in *E. coli* und Löslichkeits-Analysen.** A) Vor und nach vierstündiger Expression bei 37 °C von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> (28 kDa) in *E. coli* Rosetta2 (DE3) wurden 300 µl der Zellsuspension bei 8000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 50 µl 1x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden 5 µl analysiert. B) Das Sediment aus 1 ml der Expressionskultur wurde mit 1 ml Niedrigsalzpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) aufgeschlossen, zentrifugiert und 15 µl des Überstandes aufgetragen, das Pellet wurde in 1 ml 8 M Harnstoff gelöst und 15 µl aufgetragen. C) Es wurde die gleiche Prozedur durchgeführt wie bei B), jedoch mit Hochsalzpuffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5). v.I. – vor Induktion, n.I. – Nach Induktion, ÜS – Überstand, P – Pellet. Die SDS-PAGE-Gele wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. N = 1

In Abbildung 17A (rechts) ist eine prominente Bande bei etwa 35 kDa nach der Induktion zu erkennen im Gegensatz zur Probe vor der Induktion (Abbildung 17A, links). Diese repräsentiert das gewünschte Zielprotein His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub>. Das His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub>-Protein ist im Vergleich zu anderen *E. coli* Proteinen, welche als weitere Banden zu sehen sind, in hohen Mengen vorhanden. Im Anschluss sollte die native Anreicherung des Proteins erfolgen. Da bisher keine Informationen zur Stabilität vorhanden waren, wurden diverse Pufferbedingungen getestet. In Abbildung 17B und C sind exemplarisch SDS-PAGE-Gele dargestellt, in denen Überstand und Sediment nach Zellaufschluss in zwei verschiedenen Puffern mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Bei einem Zellaufschluss mit 200 mM NaCl und 20 mM Tris, pH 7,5 (Abbildung 17B) ist zu erkennen, dass sich das Protein ausschließlich im Sediment befand und über die Coomassiefärbung kein Protein im Überstand detektiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte beim Aufschluss mit 500 mM NaCl und 20 mM Tris, pH 7,5 ein Teil des Proteins im Überstand detektiert werden (Abbildung 17C). Trotzdem

ist auch eine starke Bande im Sediment erkennbar. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> in hohen Salzkonzentrationen eine höhere Löslichkeit vorweist als in niedrigen Salzkonzentrationen. Andere Bedingungen mit unterschiedlichen pH-Werten und Detergenzien ergaben keine erhöhte Löslichkeit des Proteins (siehe Anhang Abbildung 32).

Die native Anreicherung über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätsmatrix (3.3.3.2) erhöhte die Reinheit von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> (siehe Anhang Abbildung 33). Darauf folgend wurde eine Größenausschlusschromatographie (3.3.4) durchgeführt, um weitere Verunreinigungen zu beseitigen und eventuelle Oligomerisierungsgrade zu identifizieren. Das Chromatogramm und das SDS-PAGE-Gel der analysierten Fraktionen sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> und Analyse mithilfe einer SDS-PAGE.** **A)** Es wurden 13 ml des nativ angereicherten His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> über eine HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade gegeben. Als Laufmittel diente SEC-Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Proteine wurden nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Chromatographie wurde bei 4 °C durchgeführt. Im Ausschlussvolumen von 120 ml eluierten Aggregate (Agg), während Moleküle mit Größen zwischen 10 kDa – 600 kDa später eluierten. **B)** Proteinproben aus der SEC wurden mithilfe einer SDS-PAGE analysiert (15 % Acrylamid). Dabei wurden 15 µl VF – Vereinigte Fraktion aus der Elution der HisTrap HP als Kontrolle aufgetragen. Die Spuren sind jeweils 15 µl der Proben aus den Fraktionen der SEC (A). Das Zielprotein His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> hat eine errechnete Masse von 28,2 kDa, läuft in der SDS-PAGE auf Höhe von 35 kDa. Das SDS-PAGE-Gel wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. N = 1

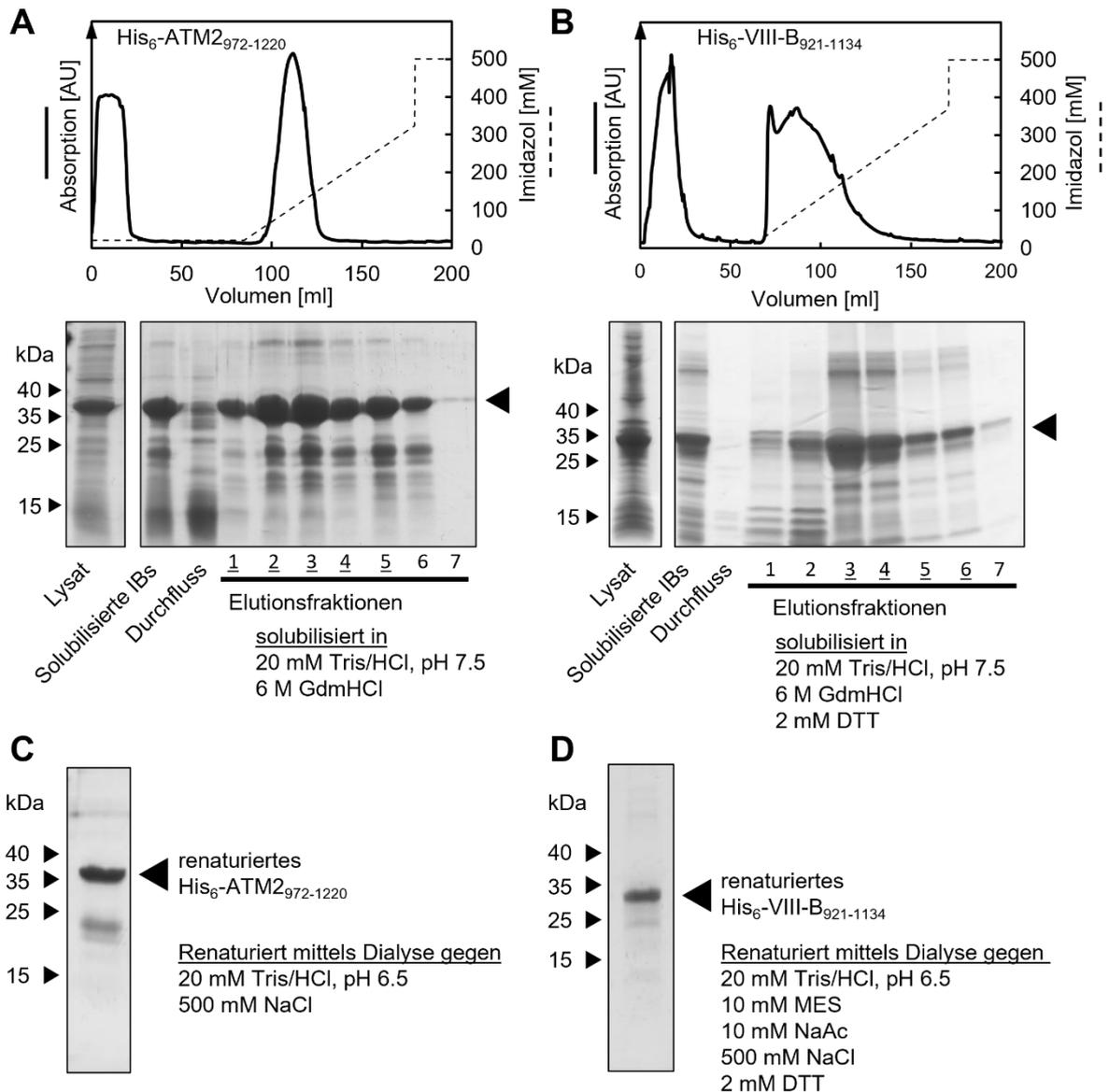
Im Chromatogramm waren zwei Hauptspitzen zu erkennen (Abbildung 18A). Die erste Spitze hatte dabei ihr Absorptionsmaximum bei 120 ml und lag damit im Bereich des Ausschlussvolumens, wobei es sich um aggregierte Proteine handelte. Die Proteinzusammensetzung wurde mithilfe der SDS-PAGE untersucht und zeigte, dass der Großteil des Aggregates His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> beinhaltete (Abbildung 18B, Agg). Die zweite Spitze hatte ihr Absorptionsmaximum bei 200 ml. Die Proteinzusammensetzungen der analysierten Fraktionen der Spitze (Abbildung 18B, 2. Spitze) waren inhomogen, zeigten aber das Vorhandensein von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub>, wobei mit späterer Elution der Anteil von Proteinen kleiner als 35 kDa größer wurde. Die Analyse verschiedener Fraktionen der zweiten Spitze mittels AUZ ergab keine auswertbaren Daten, da das Protein innerhalb eines Tages bei

20 °C proteolytisch degradiert wurde (durchgeführt von PD Dr. Hauke Lilie, MLU Halle-Wittenberg).

Aus der nativen Anreicherung von His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> wurde ersichtlich, dass dieses Protein zu einem Teil zur Aggregation neigt und zum anderen Teil zur proteolytischen Degradation. Somit konnten keine weiteren Analysen durchgeführt werden.

#### **4.2.3 Denaturierende Anreicherung und Renaturierung der C-Termini der Myosine ATM2 und VIII-B**

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Myosine der Klasse VIII aus *A. thaliana* eine Anfälligkeit zur Aggregation und gegenüber Proteasen besitzen. Daher wurden die Myosine His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> (Tabelle 16) in denaturierter Form angereichert und dann Renaturierungsversuche durchgeführt. Für diese Experimente wurden die Myosine ATM2 und VIII-B gewählt, da diese laut der Arabidopsis eFP Browser Datenbank in höheren Mengen im Pollenschlauch vorkommen (Winter *et al.*, 2007). Pollenschläuche sind ein gut untersuchtes System und wurden in der Abteilung Pflanzenbiochemie der MLU Halle-Wittenberg auch für *in vivo* Studien mit ATM2 verwendet, in die die hier erhobenen *in vitro* Daten letztlich integriert werden sollten. Für die denaturierende Anreicherung wurden die Proteine wie zuvor von einem pET28a-Vektor heterolog in *E. coli* produziert (3.2.4), Einschlusskörper isoliert (3.3.2) und in 6 M GdmHCl solubilisiert. Mithilfe der Affinitätschromatographie an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix wurden die Hexa-Histidin-markierten Proteine denaturierend angereichert (Abbildung 19A, B).

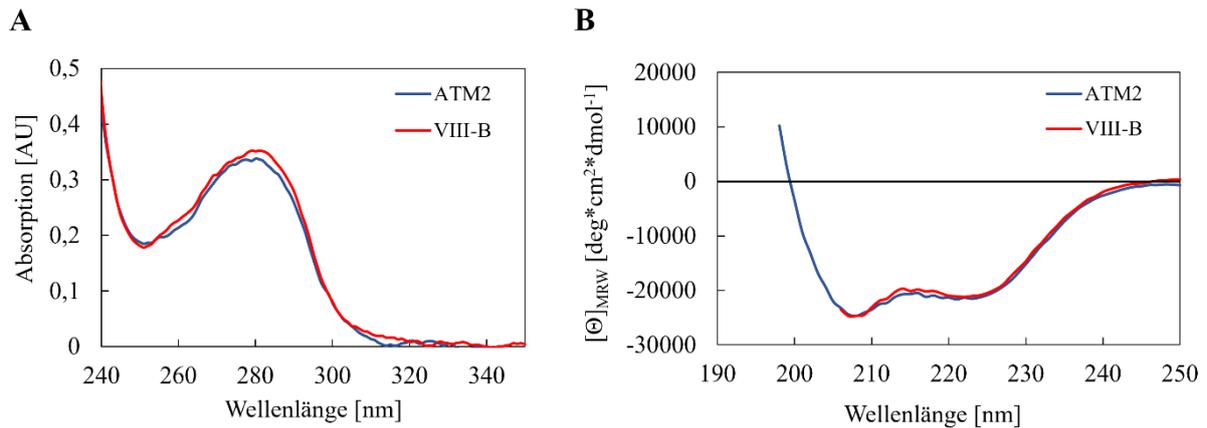


**Abbildung 19: Denaturierende Anreicherung und Renaturierung der C-terminalen Fragmente von Myosin ATM2 und VIII-B.** C-terminale Fragmente von Myosin ATM2 und VIII-B wurden rekombinant exprimiert, Einschlusskörper isoliert, affinitätschromatographisch gereinigt und anschließend renaturiert. **A), B)** Affinitätsanreicherung von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> (A) und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> (B) nach Solubilisierung im Denaturierungspuffer mit 6 M GdmHCl. Oben sind die jeweiligen Chromatogramme mit der UV-Absorption (durchgezogene Linie), die die eluierten Proteine repräsentiert, dargestellt. Die Imidazolkonzentration (gestrichelte Linie) wurde für die Elution der His<sub>6</sub>-markierten Proteine verwendet. Unten sind die Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gele der Proteinproben (jeweils 20 µl) aus den Elutionsfraktionen zu sehen. Zusätzlich wurden Lysat, solubilisierte Einschlusskörper (IBs) und Durchfluss aufgetragen (jeweils 7 µl). Jeweils auf den rechten Seiten zeigen die Pfeile das entsprechende Zielprotein. Die vereinigten Elutionsfraktionen, die für die Renaturierung verwendet wurden, sind unterstrichen. N = 1. **C), D)** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele der Proteinproben nach der Dialyse und Renaturierung der affinitätsangereicherten His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> (C) und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> (D) im jeweiligen Renaturierungspuffer. N = 4. Das Bild wurde modifiziert nach Kastner et al., 2022.

Die Affinitätsanreicherung vom denaturierten His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> (Abbildung 19A) und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> (Abbildung 19B) wurden mittels UV-Absorption chromatographisch verfolgt (Abbildung 19A, B, oben) und Fraktionen mithilfe einer SDS-PAGE und Coomassiefärbung (Abbildung 19A, B, unten) analysiert. In den SDS-PAGE-Gelen wurden in den

Elutionsfraktionen von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> eine starke Bande auf Höhe oberhalb 35 kDa und in den Elutionsfraktionen von His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> eine starke Bande auf Höhe unterhalb 35 kDa detektiert. Die Spitzen der jeweiligen Elutionen beinhalteten somit Großteile der Zielproteine. Zusätzlich waren auch andere Proteine in den SDS-PAGE-Gelen zu sehen. Die unterstrichenen Fraktionen (Abbildung 19A, B, unten) wurden vereinigt und für eine Renaturierung verwendet. Die vereinigte Elution von His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> wurde mit 2 mM DTT Endkonzentration versetzt. Aufgrund der Abwesenheit von Cysteinen bei His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> wurde auf ein Reduktionsmittel verzichtet.

Die Rückfaltung erfolgte mittels Dialyse (3.3.5.1). Anschließend wurden die Proteinlösungen zentrifugiert und der Überstand mithilfe einer SDS-PAGE (3.4.1) untersucht. Zunächst sollte ermittelt werden, welche Proteinspezies sich im Überstand nach der Renaturierung befanden und somit löslich waren. In der Probe mit dem rückgefalteten His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> war eine starke Proteinbande auf der Höhe oberhalb 35 kDa zu sehen (Abbildung 19C). Eine etwas schwächere Bande war unter 25 kDa zu sehen. Da das untersuchte Konstrukt von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> eine berechnete Masse von 31 kDa besitzt, wurde mithilfe der Massenspektrometrie (3.4.5) verifiziert, dass es sich bei den Proteinbanden um das Zielprotein handelte. Es wurde davon ausgegangen, dass das Fragment oberhalb von 35 kDa das Volllängenprotein und die Bande unterhalb von 25 kDa ein proteolytisch abgebautes Fragment ist. Für das untersuchte Myosin His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> wurde im Überstand eine starke Bande auf der Höhe unterhalb von 35 kDa detektiert (Abbildung 19D), neben schwächeren Banden im Bereich darunter. Das verwendete Konstrukt hat eine berechnete Masse von 27,5 kDa, was nicht genau mit der auf dem SDS-PAGE-Gel zu sehenden Masse übereinstimmt. Massenspektrometrische Untersuchungen konnten aber zeigen, dass es sich bei der Bande unterhalb von 35 kDa um das Myosin His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> handelt. Insgesamt zeigten die untersuchten Myosine ein unerwartetes Laufverhalten in der SDS-PAGE-Analyse. Trotz weiterer sichtbarer Banden neben den Volllängen-Myosinen wurden diese für weitere Analysen verwendet. Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt (3.5.1). Außerdem konnten die Spektren Aufschluss über den Zustand der Proteine und das Vorhandensein auf mögliche weitere absorbierende Verunreinigungen wie Nukleinsäuren geben. Aus Abbildung 20A ist zu erkennen, dass die Absorptionsspektren der beiden Lösungen proteintypische Absorptionsmaxima bei 280 nm und Minima bei 250 nm besitzen und somit keine Nukleinsäure-Verunreinigungen zu haben schienen. Da keine enzymatische Aktivität der C-Termini der Myosine der Klasse VIII bekannt ist, konnte der Erfolg der Renaturierung nicht anhand eines Aktivitätstests bestimmt werden.



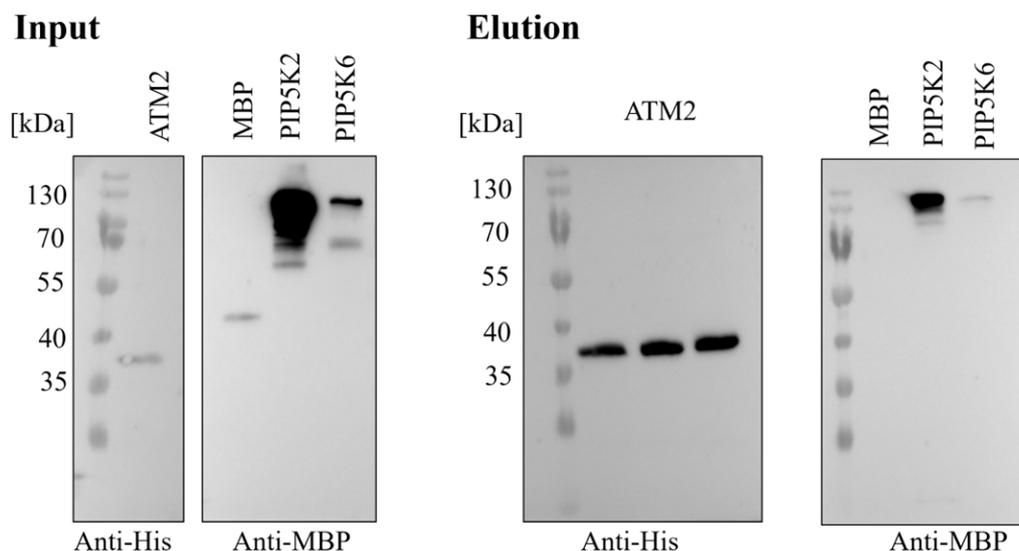
**Abbildung 20: Absorptionsspektren und CD-Spektren von renaturierten Myosinen His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub>.** Es wurden in 6 M GdmHCl solubilisierete Myosine His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> jeweils in Renaturierungspuffer über Nacht bei 4 °C rückgefaltet, zentrifugiert und der Überstand analysiert. **A)** Es sind repräsentative UV/Vis-Absorptionsspektren der renaturierten Proteine dargestellt. Die Spektren wurden um das jeweilige Renaturierungspuffer-Signal bei RT korrigiert. N = 3. **B)** Es sind repräsentative Fern-UV-CD-Spektren der renaturierten Myosine dargestellt (N = 3). Es wurde jeweils eine 0,2 mm Küvette verwendet. Die Spektroskopie wurde bei 20 °C durchgeführt, 50 nm/min Schrittgeschwindigkeit, 1 nm Schrittweite, 0,5 s Integrationszeit und einer Dynodenspannung von < 600 V. Die gemessenen Spektren wurden um das Puffer-Signal korrigiert und auf die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure (MRW) normiert.

Computer-gestützte Sequenzanalysen zeigten, dass Myosine *coiled coil*-Strukturen beinhalten, die ihre Oligomerisierung bedingen können, was auf einen hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil in der Struktur schließen lässt. Die Analyse der Sekundärstrukturen in einem Protein lässt sich mithilfe von Circular dichroismus-Spektroskopie analysieren (3.4.4). Die Elliptizität ergibt ein strukturabhängiges Spektrum. Während beispielsweise für  $\beta$ -Faltblätter ein typisches Minimum bei etwa 215 nm detektiert wird, ist bei  $\alpha$ -helikalen Strukturen ein Doppelminimum bei etwa 208 nm und 222 nm zu sehen. Aus Abbildung 20B wird ersichtlich, dass ein ausgeprägtes Doppelminimum bei 208 nm und 222 nm sowohl für His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> als auch für His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> vorhanden war. Das deutet auf einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen, wie bei einer *coiled coil* Struktur zu erwarten war. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die rückgefalteten Myosine in der Lösung nicht mehr denaturiert, sondern mit erwarteter Strukturierung vorliegen, mglw. in nativer Faltung. Die Normierungen der beiden Spektren liegen annähernd übereinander. Der Anteil an Sekundärstrukturelementen pro Aminosäure in den jeweiligen Proteinen ist also etwa gleich, was auch die hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit der Proteine widerspiegelt. Das Spektrum von Myosin His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>920-1134</sub> konnte nur bis 206 nm aufgenommen werden, da TCEP und MES im Puffer vorlagen, die in diesem Bereich stark absorbieren. Ein Erfolg der Renaturierung konnte mithilfe von Lipidbindung verifiziert werden. Dies wird später näher erläutert (4.2.5).

#### 4.2.4 Interaktionstest via *pull-down*

Mit dem nun verfügbaren angereicherten und rückgefalteten Proteinfragment von ATM2 wurden *in vitro pull-down*-Experimente durchgeführt, um die Interaktion der Myosine mit nativ gereinigtem MBP-PIP5K2- bzw. MBP-PIP5K6-Protein zu verifizieren. Als Negativkontrolle wurde MBP verwendet (3.6.1.1).

Für die Interaktionstests wurde renaturiertes His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> (4.2.3) auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix fixiert. Anschließend wurden MBP, MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6 auf der mit His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub>-beladenen Säule inkubiert, deren Mengen anhand von Gelbanden-Intensitäten abgeschätzt wurden. Die Elution erfolgte mit Imidazol. Die Zusammensetzung der eluierten Proteine wurde über eine Immunodetektion mit Anti-MBP-Antikörper bzw. Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper nachgewiesen (3.4.2.2). Es sollten die Ergebnisse des Interaktionstests aus den Hefe-Zwei-Hybrid-Studien (4.2.1) validiert werden. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass alle Myosine der Klasse VIII mit PIP5K2, aber nicht mit PIP5K6 zu interagieren scheinen. Daher wurden *pull-down*-Experimente mit diesen beiden PI4P 5-Kinasen durchgeführt. Die Ergebnisse des *pull-downs* sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Western blots vom Interaktionstest von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> mit MBP-PIP5K2, MBP-PIP5K6 und MBP via Pull-down.** Pull-down-Experiment von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> mit MBP, MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6. Rekombinant exprimiertes und renaturiertes ATM2 wurde auf Ni<sup>2+</sup>-NTA immobilisiert und mit MBP (zur Verfügung gestellt von Larissa Launhardt), MBP-PIP5K2 (nach Anreicherung über SEC), bzw. MBP-PIP5K6 (zur Verfügung gestellt von Johanna Nordmeier) inkubiert. Es wurden sowohl Input als auch Elutionen mithilfe einer Immunodetektion analysiert. Es wurde ATM2 mit einem Anti-Penta-His-Antikörper und MBP, MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6 mit einem Anti-MBP-Antikörper nachgewiesen. Der Input zeigt die eingesetzten Proteine und die Elution zeigt alle Proteine, die mit 500 mM Imidazol von der Ni<sup>2+</sup>-NTA gelöst wurden. N = 1

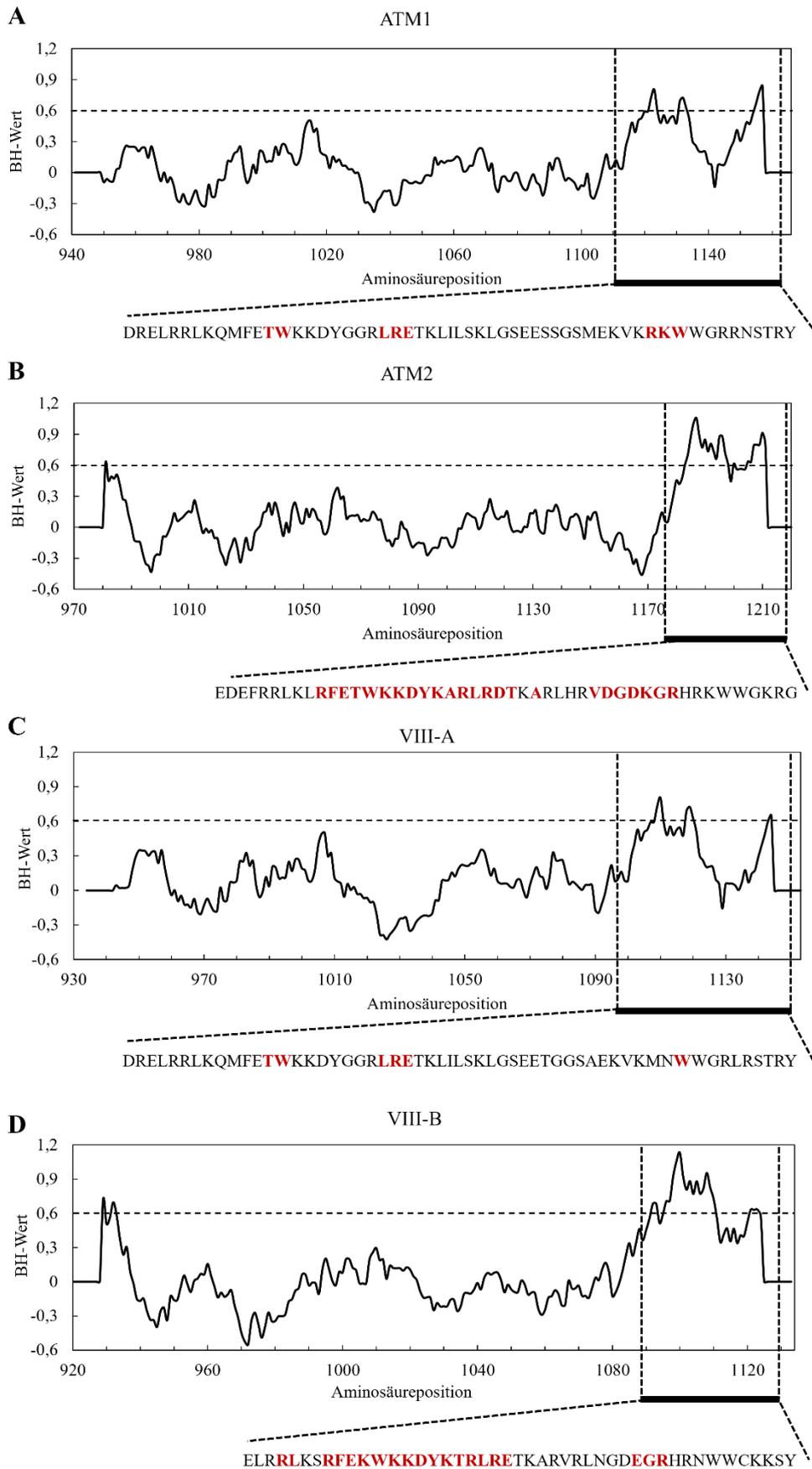
Im Idealfall hätten die eingesetzten Proteine die gleiche Konzentration haben müssen. Aufgrund der inhärenten Unsicherheit bei der Mengenbestimmung war dies nicht möglich. Es

ist zu erkennen, dass PIP5K2 um ein Vielfaches höher konzentriert vorlag im Vergleich zu MBP und PIP5K6 (Abbildung 21, Input). Die Analyse der Zusammensetzung der eluierten Proteine ergab, dass His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> in jedem Fall an das Säulenmaterial gebunden wurde (Abbildung 21, Elution ATM2). Bei der Inkubation mit MBP als Negativkontrolle war zu beobachten, dass dieses Protein wie erwartet nicht an ATM2 gebunden war. Bei den anderen Elutionen konnten sowohl PIP5K2 als auch PIP5K6 mittels MBP-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 21, Elution MBP, PIP5K2, PIP5K6). Das deutet darauf, dass beide PI4P 5-Kinasen im *pull-down*-Test mit ATM2 interagieren konnten. Aufgrund der unterschiedlichen eingesetzten Mengen ist eine quantitative Interpretation der Ergebnisse nicht möglich. Nach diesem Experiment konnte die Interaktion zwischen ATM2 und PIP5K2 vom Hefe-Zwei-Hybrid-Test verifiziert werden. Die im *pull-down*-Test beobachtete Interaktion zwischen ATM2 und PIP5K6 hat dagegen keine Entsprechung in den Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen (Abbildung 14, rechts), zeigt aber, dass eine Interaktion zwischen PIP5K6 und Myosinen der Klasse VIII möglich sein könnte. Lisa Freitag konnte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit eine Interaktion zwischen dem nativ gereinigtem His<sub>6</sub>-ATM1<sub>941-1166</sub> und PIP5K2 in einem *pull-down*-Experiment beobachten, was eine Interaktion zwischen Myosinen der Klasse VIII und PIP5K2 bestätigt (Lisa Freitag und Ingo Heilmann, MLU Halle-Wittenberg, unveröffentlicht). Die Ergebnisse der verschiedenen Interaktionstests zeigen eine Interaktion von PI4P 5-Kinasen mit Myosinen der Klasse VIII an, die zuvor nicht bekannt war. Da postuliert wurde, dass Myosine der Klasse VIII eine Funktion am Interface zwischen Plasmamembran und dem Aktin-Zytoskelett haben (Ryan und Nebenführ, 2018), wurde im Folgenden untersucht, ob es neben der Interaktion mit PI4P 5-Kinasen weitere Bezüge der Klasse VIII-Myosine zu Phosphoinositiden gibt.

#### 4.2.5 Myosine der Klasse VIII binden anionische Phospholipide

Obwohl die pflanzlichen Myosine der Klasse VIII seit über 20 Jahren bekannt sind (Reichelt et al., 1999), ist nur wenig über die physiologische Funktion des C-terminalen Bereiches bekannt. Dies steht im Gegensatz zur besser charakterisierten Motorregion am N-Terminus der Myosine. Es war daher ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die Funktion der C-terminalen Domänen zu beleuchten, die mglw. der Bindung von Frachtstrukturen dienen. Da Myosine der Klasse VIII aus *A. thaliana* überwiegend an der Plasmamembran lokalisieren (Avisar et al., 2009), wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Lokalisation eventuell über Lipidbindung erfolgen könnte, mglw. speziell über die Bindung an Phosphoinositide. Um Regionen für eventuelle Bindung an anionische Lipide in einem Protein vorherzusagen,

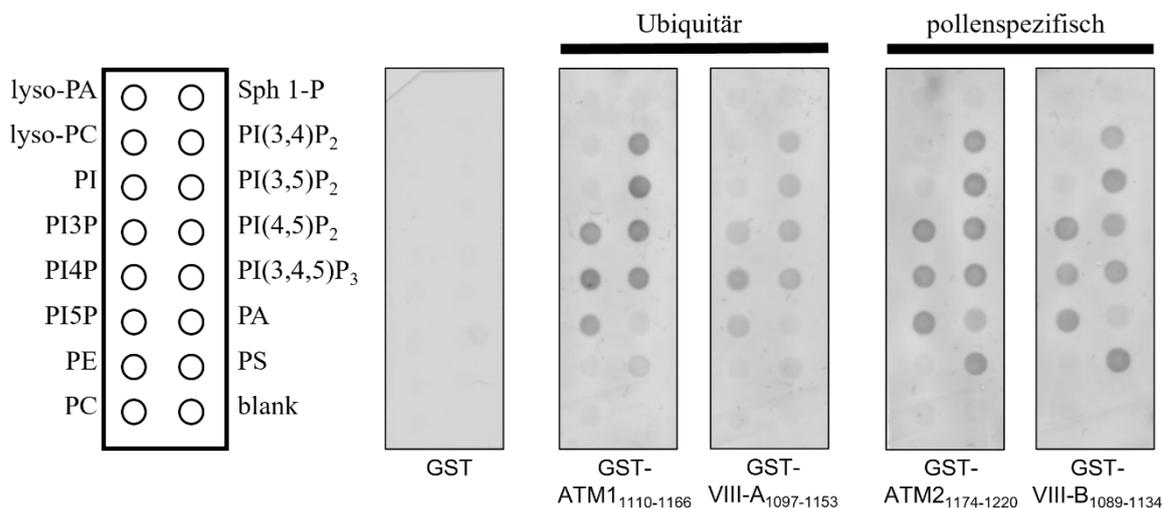
können anhand der Sequenzinformation eines Proteins für jede Seitenkette im Verbund sogenannte *basic/hydrophobic* (BH)-Werte bestimmt und als BH-Plots dargestellt werden. Die Bewertung der Seitenketten anhand ihrer BH-Werte identifiziert mögliche membranbindende Stellen in einem Protein basierend auf den hydrophoben und basischen Eigenschaften, wobei BH-Werte über 0,6 Regionen anzeigen, die für eine mögliche Bindung an anionische Lipide in Frage kommen (Brzeska et al., 2010). Für die C-terminalen Regionen aller Myosine der Klasse VIII aus *A. thaliana* konnten Bereiche definiert werden, in denen dieser Schwellenwert deutlich überschritten wurde (Abbildung 22). Die pollenspezifischen Myosine ATM2 (Abbildung 22B) und VIII-B (Abbildung 22D) haben dabei einen größeren flächendeckenden Bereich am extremen C-terminalen Ende, während die ubiquitär-exprimierten Myosine ATM1 (Abbildung 22A) und VIII-A (Abbildung 22C) drei Hauptspitzen am extremen C-terminalen Ende besitzen. Im Gegensatz zu den Myosinen der Klasse VIII besitzen die C-terminalen Regionen der Myosine der XI keine Sequenzbereiche, in denen BH-Werte über 0,6 auftreten. Im Anhang ist beispielhaft eine BH-Plot-Analyse des C-Terminus von Myosin XI-1 dargestellt (Abbildung 35).



**Abbildung 22:** BH-Plot-Analyse von den Myosinen der Klasse VIII aus *A. thaliana*. BH-Werte der einzelnen Aminosäuren der C-Termini von **A)** ATM1, **B)** ATM2, **C)** VIII-A, **D)** VIII-B. Die Analyse basiert auf Brzeska et

al., 2010. Polybasische Regionen an den extremen C-Termini der Myosine wurden identifiziert (gestrichelte Linien) und für die weitere Analyse ausgewählt. BH-Werte über 0,6 (rotmarkierte Aminosäuren) deuten auf eine mögliche Bindungsstelle für anionische Phospholipide.

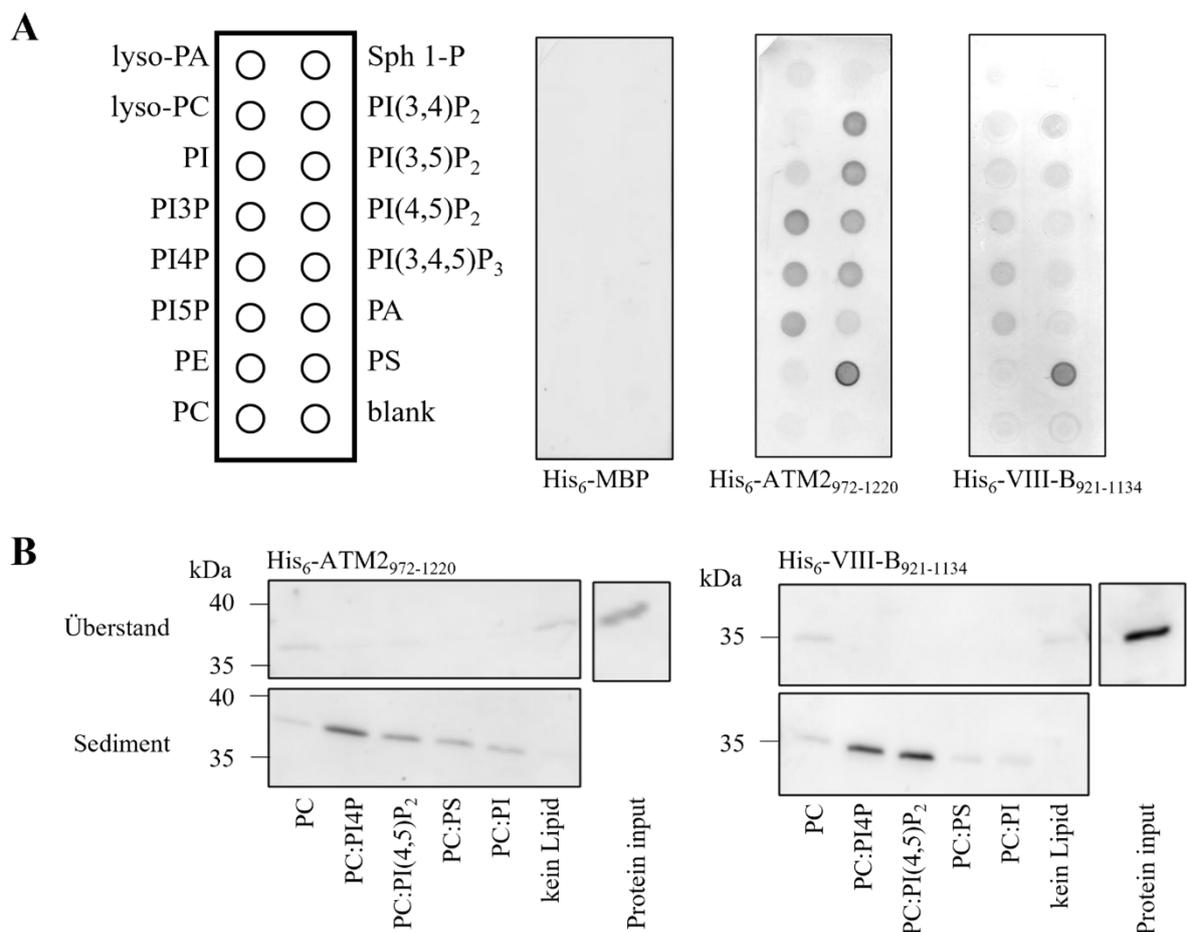
Um zu ermitteln, ob die in Frage kommenden Bereiche tatsächlich eine Lipidbindung vermitteln, wurden die letzten 45 - 57 Aminosäuren jeweils als Fusionen an ein N-terminales GST exprimiert (siehe Konstrukte Tabelle 16). Die Proteine wurden in *E. coli* Rosetta2-Zellen hergestellt (3.2.4) und im entsprechenden Aufschlusspuffer stabilisiert (3.3.1.1). Für die ersten Lipid-Bindungsstudien wurden *Lipid-overlay*-Tests durchgeführt (3.6.2.1). Dafür wurden jeweils 100  $\mu$ l der Überstände der Lysate verwendet. Nach Inkubation mit den kommerziellen *PIP strips* (Echelon Biosciences Inc., MoBiTec, Göttingen, Deutschland) wurden an Lipid gebundene Proteine mittels Immunodetektion nachgewiesen (3.4.2.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Lipid-Bindungsstudien der C-terminalen Fragmente der Myosine der Klasse VIII.** Es wurden die C-terminalen Aminosäuren von den ubiquitär exprimierten Myosinen ATM1 (57) und VIII-A (57), bzw. den pollenspezifischen Myosinen ATM2 (45) und VIII-B (46) jeweils N-terminal an GST fusioniert und mittels *Lipid-overlay*-Test analysiert. Als Negativkontrolle wurde GST allein verwendet. Links sind die Positionen der getropften Lipide dargestellt. N = 2. PC – Phosphatidylcholin; PE - Phosphatidylethanolamin; PI – Phosphatidylinositol; PI3P – PI-3-Phosphat; PI4P – PI-4-Phosphat; PI5P – PI-5-Phosphat; PI(3,4)P<sub>2</sub> – PI-3,4-Bisphosphat; PI(3,5)P<sub>2</sub> – PI-3,5-Bisphosphat; PI(4,5)P<sub>2</sub> – PI-4,5-Bisphosphat; PI(3,4,5)P<sub>3</sub> – PI-3,4,5-Trisphosphat; PA - Phosphatidsäure; PS - Phosphatidylserin; Sph 1-P – Sphingosin-1-Phosphat. Lipide mit dem Präfix lyso haben anstatt zwei veresterter Fettsäuren nur eine. Das Bild wurde modifiziert nach Kastner et al., 2022.

Aus Abbildung 23 ist zu erkennen, dass alle Phosphoinositide mit Ausnahme von PI von den GST-markierten Myosin-Fragmenten aus den Lysaten gebunden wurden. Es handelt sich dabei um anionische Lipide. Die Bindung scheint aber nicht ausschließlich über die negative Ladung der Lipide zu erfolgen, da kein Signal bei der negativ geladenen Phosphatidsäure detektiert wurde. Die Intensitäten der einzelnen Signale aller Myosine unterscheiden sich, was auf verschiedene Proteinmengen oder Bindungsaffinitäten zurückzuführen ist. Die pollenspezifischen Myosine ATM2 und VIII-B zeigten zusätzlich ein Signal für die Bindung

an PS, ein weiteres anionisches Lipid. Als Negativkontrolle wurde GST allein verwendet. Dieses war nicht in der Lage, Lipide zu binden. Die Daten deuten darauf hin, dass die C-terminalen Aminosäuren der Myosine der Klasse VIII ausreichen, um eine Lipidbindung *in vitro* an anionische Phosphoinositide und PS zu vermitteln. Im nächsten Schritt sollten die lipidbindenden Eigenschaften der renaturierten pollenspezifischen Myosine His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>920-1134</sub> geprüft werden. Als Negativkontrolle wurde His<sub>6</sub>-MBP verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Lipidbindungsstudien der renaturierten C-terminalen Fragmente von Myosin ATM2 und VIII-B.** Die renaturierten Myosine His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> und His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> wurden auf *in vitro* Lipidbindung analysiert. **A)** Für den *Lipid-overlay*-Test wurden vorgefertigte PIP *strips* (Echelon Biosciences Inc., MoBiTec, Göttingen, Deutschland) und etwa 2,5 µg/ml der renaturierten Proteine verwendet. His<sub>6</sub>-MBP diente als Negativkontrolle. Links sind die Positionen der getropften Lipide dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für drei His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub>- und zwei His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub>-Experimente. Experimente wurden u.a. von Dr. Mareike Heilmann durchgeführt. **B)** Für den Liposomen-Sedimentationstest wurden Liposomen auf PC-Basis hergestellt, die 10 Mol-% andere Lipide enthielten. Die Lipidbindung wurde mit dem Nachweis der His<sub>6</sub>-markierten Proteine in den Sedimenten angezeigt. Liposomen, die nur PC enthielten und Proben ohne Lipid dienten als Negativkontrolle. Links, Liposomen-Sedimentationstest mit 200 nmol Lipiden und 250 ng renaturiertem His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub>. Rechts, Liposomen-Sedimentationstest mit 400 nmol Lipiden und 500 ng renaturiertem His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub>. N = 2. Die Liposomen-Sedimentationstests wurden von Vera Wagner im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. PC – Phosphatidylcholin; PE – Phosphatidylethanolamin; PI – Phosphatidylinositol; PI3P – PI-3-Phosphat; PI4P – PI-4-Phosphat; PI5P – PI-5-Phosphat; PI(3,4)P<sub>2</sub> – PI-3,4-Bisphosphat; PI(3,5)P<sub>2</sub> – PI-3,5-Bisphosphat; PI(4,5)P<sub>2</sub> – PI-4,5-Bisphosphat; PI(3,4,5)P<sub>3</sub> – PI-3,4,5-Trisphosphat; PA – Phosphatidsäure; PS –

Phosphatidylserin; Sph 1-P – Sphingosin-1-Phosphat. Lipide mit dem Präfix lyso haben anstatt zwei veresterter Fettsäuren nur eine. Das Bild wurde modifiziert nach Kastner et al., 2022.

Beim *Lipid-overlay*-Test mit den renaturierten Myosin-Fragmenten von ATM2 und VIII-B konnte ein sehr ähnliches Lipid-Bindungsmuster beobachtet werden (Abbildung 24A) wie bei den verkürzten GST-Fusionsvarianten (Abbildung 23, rechts), wobei die Signale bei VIII-B schwächer waren. Aufgrund der verschiedenen Varianten und Aufarbeitungen der Proteine kann festgehalten werden, dass weder die Fusion am Protein noch die Pufferbedingungen einen Einfluss auf die Lipidbindung hatten. Die Lipidbindung kann somit als Eigenschaft der untersuchten Myosine gewertet werden. Damit wird die Aussage bestärkt, dass die renaturierten C-Termini der untersuchten Myosine eine native Faltung aufweisen (4.2.3).

Die Ergebnisse der Lipidbindung wurden mithilfe eines Liposomen-Sedimentationstests (3.6.2.2) validiert. Bei Liposomen handelt es sich um Vesikel, die aus einer Lipid-Doppelmembran bestehen. Diese ähnelt einer physiologischen Membran stärker als die konzentriert angebotenen Lipide in einem *Lipid-overlay*-Test. Um auszuschließen, dass das Protein während der Prozedur unabhängig von der Liposomenbindung aggregiert und im Sediment detektiert wird, wurde ein Test ohne Lipid durchgeführt. Die Liposomen wurden sedimentiert, der Überstand entfernt und beide Fraktionen mithilfe einer Immunodetektion (3.4.2) auf ihren Gehalt an gebundenem Myosin-Fragment geprüft. Bei erfolgreicher Lipidbindung sollte das untersuchte Protein an den Liposomen im Sediment zu detektieren sein. In Abbildung 24B (links) ist die Immunodetektion des Liposomen-Sedimentationstests für ATM2 dargestellt. Es wurde sowohl Überstand als auch Sediment analysiert. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zum eingesetzten Protein (Protein Input) eine schwache Bande im Sediment und im Überstand von PC zu erkennen ist. Ein stärkeres Signal ist bei den Liposomen mit PI4P zu sehen, was auf eine Bindung von ATM2 an PI4P hindeutet. Das Signal war vergleichbar mit dem des eingesetzten Proteins. Im Vergleich dazu waren schwächere Banden bei Liposomen mit PI(4,5)P<sub>2</sub>, PS und PI zu beobachten, was auch auf eine Bindung an diese Lipide hinweist. Von den gebundenen Lipiden erschien die Bindung an PI4P am stärksten. Für einen Liposomen-Bindungstest ungewöhnlich war das weitgehende Fehlen von Proteinsignalen im Überstand, selbst bei geringer oder fehlender Bindung an Liposomen (Abbildung 24B, links, Überstand). Da in Kontrollansätzen ohne Lipid ebenfalls kaum Protein im Überstand und eine sehr schwache Bande im Sediment zu erkennen war, ist denkbar, dass das ATM2-Protein zur Aggregation neigt und auch ohne Liposomen sedimentierte, während restliches Protein proteolytisch abgebaut wurde. Qualitativ bestätigen

die Ergebnisse des Liposomen-Sedimentations-Tests die des vorherigen *Lipid-overlay*-Tests, mit der Einschränkung, dass die jeweiligen Signalintensitäten nicht übereinstimmen.

Beim Liposomen-Sedimentations-Test mit Myosin VIII-B war, basierend auf den vorherigen *lipid-overlay*-Tests, ein ähnliches Ergebnis zu erwarten wie bei Myosin ATM2. Aus Abbildung 24B (rechts) wird jedoch ersichtlich, dass sehr starke Bandenintensitäten bei PI4P und PI(4,5)P<sub>2</sub> im Sediment zu erkennen sind, wohingegen schwächere Banden bei PS und PI detektiert wurden. Im Überstand konnten nur schwache Signale bei PC und beim Ansatz ohne Lipid detektiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre auch hier die proteolytische Anfälligkeit der Myosine ähnlich wie bei ATM2. Das Myosin VIII-B scheint insgesamt eine ähnliche Affinität zu PI4P und PI(4,5)P<sub>2</sub> zu haben, während ATM2 eine höhere Affinität zum Phosphatidylinositol-Monophosphat aufweist und nur eine geringere Affinität zu PS oder PI zu haben scheint.

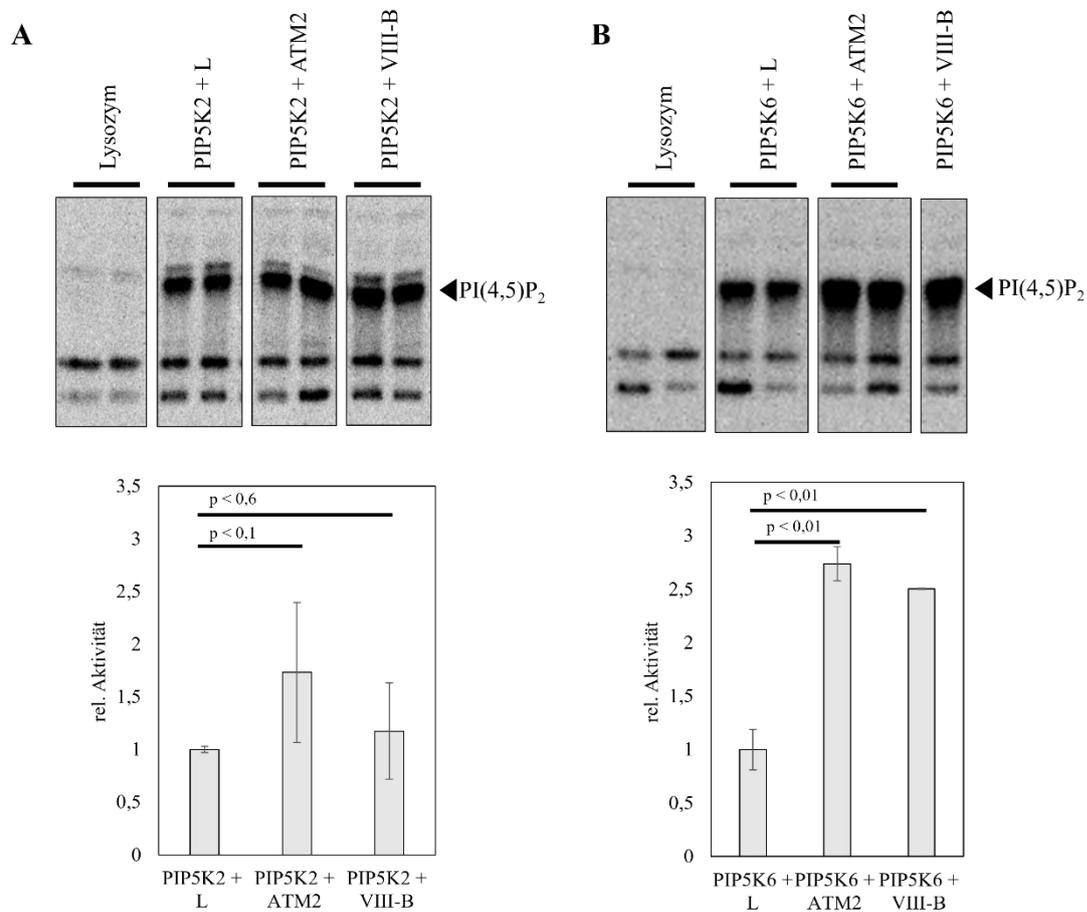
Insgesamt besitzen sowohl ATM2 als auch VIII-B die Fähigkeit, anionische Lipide zu binden.

#### **4.2.6 ATM2 und VIII-B modulieren die enzymatische Aktivität von PI4P 5-Kinasen *in vitro***

Die bisherigen Experimente identifizierten Myosine der Klasse VIII als Interaktionspartner von PI4P 5-Kinasen. Weiterhin banden die getesteten Myosine anionische Phospholipide, von denen PI4P und PI(4,5)P<sub>2</sub> als Substrat und Produkt an der PI4P 5-Kinase-vermittelten Reaktion teilnehmen. Da eine Grundfrage der vorliegenden Arbeit war, inwiefern eine Interaktion mit Partnerproteinen zu einer Funktionsänderung der PI4P 5-Kinasen führen kann, wurde anhand der neu identifizierten Myosin-Interaktion ein Einfluss auf die katalytische Funktion der PI4P 5-Kinasen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde ein Aktivitätstest der zu untersuchenden PI4P 5-Kinasen in Anwesenheit der rekombinanten rückgefalteten Myosine durchgeführt. Es wurden 10 µl von MBP-PIP5K2-Anreicherung nach der Größenausschlusschromatographie eingesetzt und 1 µg von MBP-PIP5K6 (von Johanna Nordmeier zur Verfügung gestellt). Zusätzlich wurden jeweils 5 µg der entsprechenden C-Termini der renaturierten Myosine der Klasse VIII für eine Stunde bei RT mit den PI4P 5-Kinasen inkubiert. Die Negativkontrolle war Lysozym allein. Der Test wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (3.6.3). Die detektierten Banden wurden mithilfe von ImageQuant TL quantifiziert, um das Signal der Negativkontrolle korrigiert und mit den Signalen der PI4P 5-Kinasen zusammen mit Lysozym in Relation gebracht. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.6.3.1

beschrieben. Alle generierten Daten liegen statistisch normalverteilt vor. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25: Aktivitätstest von PIP5K2 und PIP5K6 mit den C-terminalen Fragmenten von Myosin ATM2 und VIII-B.** Rekombinant exprimierte PI4P 5-Kinasen wurden mit 5 mM DTT und 5  $\mu$ g Lysozym (L), Myosin His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub>, bzw. His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> für 1 h bei RT und anschließend für 15 min bei RT mit dem Reaktionsmix inkubiert. Die Reaktion wurde mit Chloroform:Methanol (1:2 (v/v)) abgestoppt und eine saure Lipid-Extraktion durchgeführt. Die Lipide wurden mithilfe einer Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Kieselgel-Platten wurden über Nacht auf Imager-Platten exponiert. Die Detektion von radioaktivmarkierten Phosphaten an Lipiden erfolgte mit einem Phosphorimager. **A)** Es wurden pro Reaktion 10  $\mu$ l MBP-PIP5K2 verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurden 5  $\mu$ g Lysozym verwendet. Es wurde pro Experiment und Reaktion eine Doppelbestimmung durchgeführt (N = 3, n = 4 – 6). Oben ist eine repräsentative Dünnschichtplatte zu sehen, unten die quantitative Auswertung, wobei die relative Aktivität von MBP-PIP5K2 mit den verschiedenen Myosinen zu MBP-PIP5K2 mit Lysozym aufgetragen wurde. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die Signifikanzen über dem Diagramm wurden mithilfe des T-Tests bestimmt. **B)** Es wurden pro Reaktion 1  $\mu$ g MBP-PIP5K6 verwendet (zur Verfügung gestellt von Johanna Nordmeier, Konzentration über Bradford-Methode bestimmt). Als Negativ-Kontrolle wurden 5  $\mu$ g Lysozym verwendet. Es wurde pro Experiment und Reaktion eine Doppelbestimmung durchgeführt (N = 2, n = 3 – 4). Oben ist eine repräsentative Dünnschichtplatte zu sehen, unten die quantitative Auswertung, wobei die relative Aktivität von MBP-PIP5K6 mit den verschiedenen Myosinen zu MBP-PIP5K6 mit Lysozym aufgetragen wurde. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die Signifikanzen über dem Diagramm wurden mithilfe des T-Tests bestimmt.

In Abbildung 25A (oben) ist ein repräsentativer Aktivitätstest von MBP-PIP5K2 mit Lysozym, bzw. den C-terminalen renaturierten Myosinfragmente ATM2 und VIII-B gezeigt. Die Spuren mit MBP-PIP5K2 zeigten jeweils eine deutliche Produktbande im Gegensatz zur

Negativkontrolle mit Lysozym allein, die das Reaktionsprodukt  $PI(4,5)P_2$  anzeigt. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten (Abbildung 25A, unten) ergab eine nicht signifikante 1,7-fach erhöhte Aktivität von PIP5K2 mit His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> ( $p < 0,1$ ) und eine nicht signifikante 1,2-fach erhöhte Aktivität mit His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> ( $p < 0,6$ ) im Vergleich zu PIP5K2 mit Lysozym. Die Standardabweichungen lassen bei der begrenzten Zahl an durchgeführten Experimenten bislang keine eindeutige Interpretation zu, doch ist offensichtlich, dass v.a. die Zugabe von His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> eine Tendenz zu einer Aktivitätssteigerung zeigt.

Deutlicher war das Ergebnis beim Test des Effektes der Myosine auf MBP-PIP5K6. Bei den repräsentativen Aktivitätstests der MBP-PIP5K6 konnten im Gegensatz zu Lysozym als Negativkontrolle ebenfalls deutliche Bande detektiert werden, die das Produkt  $PI(4,5)P_2$  darstellen (Abbildung 25B, oben). Die quantitative Auswertung der Produktbanden ist in Abbildung 25B (unten) gezeigt. Bei der Inkubation mit den Myosin-Fragmenten war eine deutlich stärkere und signifikante 2,7-fache Erhöhung der Aktivität mit His<sub>6</sub>-ATM2<sub>972-1220</sub> ( $p < 0,01$ ) bzw. eine 2,5-fache Erhöhung der Aktivität mit His<sub>6</sub>-VIII-B<sub>921-1134</sub> ( $p < 0,01$ ) zu verzeichnen.

Insgesamt zeigen die dargestellten Ergebnisse eine neue Interaktion zwischen PI4P 5-Kinasen und Myosinen der Klasse VIII. Die Bindung der Myosine an anionische Phospholipide sowie ihre mögliche Verbindung mit einer Regulation von Enzymen des Membranlipidstoffwechsels stellen wichtige Ansatzpunkte für künftige Studien zur funktionellen Charakterisierung der Myosine der Klasse VIII dar.

## 5 Diskussion

### 5.1 Native Anreicherung pflanzlicher PI4P 5-Kinasen

PI4P 5-Kinasen sind für die Synthese des Signallipids PI(4,5)P<sub>2</sub> aus PI4P und ATP verantwortlich und spielen eine entscheidende Rolle bei diversen Stoffwechselreaktionen in eukaryotischen Zellen. PI4P 5-Kinasen werden in Subfamilie A und B eingeteilt. Während tierische Organismen Enzyme besitzen, die der pflanzlichen Subfamilie A ähneln, finden sich in Pflanzen überwiegend Vertreter der Subfamilie B. Im Gegensatz zur Subfamilie A haben diese zusätzliche Domänen am N-Terminus, wie die NT-Domäne, die MORN-repeat- und die Linker-Region, deren Funktion noch nicht komplett verstanden sind (Mueller-Roeber und Pical, 2002; Heilmann und Heilmann, 2022). Die strukturelle Analyse pflanzlicher PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana* sollte Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion geben. Dazu wurden zwei Vertreter der Subfamilie B (PIP5K2 und PIP5K6) jeweils mit N-terminal fusioniertem MBP in *E. coli* exprimiert und nach etablierten Protokollen angereichert (AG Heilmann). Andere Fusionen konnten bisher kein lösliches Protein generieren. Eine strukturelle Untersuchung wie die Aufklärung der Tertiärstruktur von Proteinen mithilfe von Röntgenkristallographie oder Kryoelektronenmikroskopie erfordert in der Regel eine hohe Menge an homogenen Proteinspezies. Nach dem ersten Anreicherungsschritt über eine Amylose-Matrix war nur ein geringer Teil des Volllängenproteins (Sowohl PIP5K2 als auch PIP5K6) angereichert worden und viele weitere Proteinspezies vorhanden (Abbildung 9A und Abbildung 10A). Daher sollten weitere Reinigungsschritte erfolgen, um die Reinheit der Proteine zu erhöhen. Aufgrund der Tatsache, dass PI4P 5-Kinasen eine Sequenzregion haben, die als Dimerisierungsdomäne beschrieben wird (Mueller-Roeber und Pical, 2002) und im tierischen System PI4P 5-Kinasen dimerisieren (Rao et al., 1998; Hu et al., 2015), wurde angenommen, dass auch pflanzliche PI4P 5-Kinasen Dimere bilden. Die nativen Fusionsproteine hätten demnach ein Molekulargewicht von etwa 260 kDa für MBP-PIP5K2, bzw. 250 kDa für MBP-PIP5K6. Daher wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 gewählt, die einen idealen Trennbereich zwischen 20 und 600 kDa hat. Nach erfolgter Chromatographie von MBP-PIP5K2 wurde ersichtlich, dass das Protein im Ausschlussvolumen ( $M > 600$  kDa) eluierte, was einen Hinweis auf Aggregation darstellt (Abbildung 9C). Die Analyse von MBP-PIP5K6 nach dem ersten Reinigungsschritt mittels AUZ ergab ebenfalls, dass das Volllängenprotein aggregierte (Abbildung 10B). Da die Proteine trotz beobachteter

Aggregation eine enzymatische Aktivität zeigten (Abbildung 11), wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Aggregation nicht auf kompletter Fehlfaltung beruhen kann. Aufgrund der enzymatischen Aktivität und der Tatsache, dass die N-terminalen Bereiche weder strukturell noch funktional komplett aufgeklärt wurden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der N-terminale Bereich zur Aggregation neigt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden in ersten Versuchen die katalytische Domäne mit der Dimerisierungsdomäne von PIP5K2 und PIP5K6 als MBP-Fusionsprotein exprimiert, über eine Amylose-Matrix angereichert und eine anschließende Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dabei war zu sehen, dass die Proteine im Ausschlussvolumen eluierten, was auf Aggregation deutet (siehe Anhang Abbildung 29A und B). Diese Experimente müssen wiederholt, die entsprechenden Proteine über AUZ analysiert und ihre enzymatische Aktivität geprüft werden. Das Aggregationsverhalten scheint aber nicht ausschließlich über den N-terminalen Bereich zu erfolgen.

Es ist bekannt, dass pflanzliche PI4P 5-Kinasen in ihrer natürlichen Umgebung in Nanodomänen angereichert vorliegen und somit auch mit anderen Proteinen, Lipiden und mglw. miteinander assoziieren könnten (Fratini et al., 2021). Das heißt, es ist denkbar, dass eine natürliche Neigung von PI4P 5-Kinasen zur Aggregation existiert. *In vivo* könnte dies ein gesteuerter Prozess sein, während *in vitro* in Abwesenheit der natürlichen Bindungspartner unspezifisches Aggregationsverhalten vorherrscht. Ein beobachtetes ungewöhnliches Migrationsverhalten der Vollängenproteine könnte mit Verunreinigungen wie Nukleinsäuren oder Lipiden, die an die Proteine binden, zusammenhängen, so dass das apparente Molekulargewicht höher liegt als erwartet. In der Tat wurden in PI4P 5-Kinase-Präparationen Nukleinsäuren detektiert (Abbildung 9C). Dies erschwerte zusätzlich die spektroskopische Abschätzung der Konzentration der Proteine. Da PI4P 5-Kinasen ATP bzw. ADP binden, könnte ein Absorptionssignal bei 260 nm die Anwesenheit dieser Nukleotide widerspiegeln. Diese kleinen Moleküle sollten aber keine Aggregation begünstigen. Es könnte sich aber auch um größere Nukleinsäurefragmente handeln, an denen mehrere Proteine binden, dann würde das als Aggregation über SEC und AUZ gemessen werden. Denkbar wären zum Beispiel tRNAs. Da ein DNase-Verdau bei der Anreicherung der PI4P 5-Kinasen durchgeführt wurde und diese ausschließlich DNA-Moleküle katalytisch spaltet, sollten theoretisch nur RNA-Moleküle in der Lösung vorhanden sein. Einzelsträngige RNAs, wie sie in *E. coli* in Form von mRNAs beispielsweise vorkommen, sind anfällig für RNAsen. Im Gegensatz dazu stellen tRNAs mit ihrer Sekundärstruktur eine stabilere Form dar im Vergleich zu anderen RNA-Molekülen. Erwartungsgemäß sollten die meisten Proteine keine tRNAs binden. Sollte jedoch

eine unspezifische Bindung von PI4P 5-Kinasen an RNAs erfolgen, so könnte das über tRNAs geschehen. Eine Nukleinsäurebindung von PI4P 5-Kinasen wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch wurde PIP5K2 aus *A. thaliana* bereits im Zellkern lokalisiert (Gerth et al., 2017a). Da noch nicht komplett geklärt ist, welche Funktionen PI4P 5-Kinasen im Nukleus besitzen, ist es vorstellbar, dass mithilfe von Nukleinsäurebindung die Lokalisation u.a. erklärt werden könnte. PI4P 5-Kinasen sind membranassoziiert, wodurch die Möglichkeit auf Lipidbindung besteht. Dadurch ist es denkbar, dass das apparente Aggregationsverhalten auch aufgrund von Lipidbindung hervorgerufen werden könnte, bspw. in Form mizellarer Strukturen. Solche Verunreinigungen könnten mithilfe von Detergenzien eventuell unterbunden werden, jedoch müssten diese dann anschließend aus der Proteinpräparation entfernt werden, da strukturelle Analysen erschwert werden könnten. Die meisten Detergenzien absorbieren im Nah- und Fern-UV, was beispielsweise CD- und Absorptionsspektroskopie unmöglich macht. Unabhängig davon, ob die apparente Aggregation aufgrund von fehlgefalteten Teilen der Proteine oder Verunreinigungen zustande kommt, waren proteinbiochemische Analysen aus den genannten Gründen im Rahmen dieser Arbeit nur in geringem Umfang möglich. Um rekombinante PI4P 5-Kinasen zu *in vitro* Untersuchungen zu erhalten, wurden die Proteine denaturierend angereichert und Renaturierungsstrategien getestet.

## 5.2 Renaturierungsstrategien pflanzlicher PI4P 5-Kinasen

Die möglichen Gründe für das Aggregationsverhalten rekombinant exprimierter PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana* sind vielseitig. Eine Möglichkeit dieses Verhalten zu unterbinden wäre die Wahl eines eukaryotischen Expressionssystems, zum Beispiel Hefe-, Säuger- oder Insektenzellen. Der Vorteil hierbei wäre, dass posttranslationale Modifikationen eine Situation für das Protein darstellen, die dem physiologischen Zustand näher kommt und die Löslichkeit damit erhöhen könnte. Außerdem könnte mithilfe passender Chaperone die Faltung begünstigt werden. Ein Nachteil ist, dass die Menge an auf diese Weise erhaltenem Protein oft gering ist und Experimente lange dauern (Murphy et al., 2004; Zhu, 2012; Rosano und Ceccarelli, 2014; Yilmaz et al., 2019). Methoden zur Anreicherung unmodifizierter Proteine haben zudem den Vorteil, dass z. B. der Einfluss von Proteinkinasen auf die Struktur und Funktion von PI4P 5-Kinasen ohne vorherige Modifikation besser untersucht werden kann. In *E. coli* werden kaum Enzyme exprimiert, die posttranslationale Modifikationen an Proteinen durchführen und in vorherigen Arbeiten wurden mit in *E. coli* exprimiertem Protein

Phosphorylierungsstellen von PI4P 5-Kinasen identifiziert und der Einfluss auf Struktur und Funktion näher untersucht (Hempel et al., 2017; Lin et al., 2019; Menzel et al., 2019). Da die native Anreicherung von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6 aus *E. coli* im Rahmen dieser Arbeit keine Proteine ergab, die ohne Weiteres für strukturelle oder spektroskopische Analysen genutzt werden konnten, wurden aggregierte Proteine in Form von Einschlusskörpern aus *E. coli* isoliert, in 6 M GdmHCl-Lösung denaturierend solubilisiert und anschließend renaturiert. Dazu wurden neue cDNA-Konstrukte für eine N-terminale SUMO-Fusion an PIP5K2 und PIP5K6 hergestellt. SUMO wurde als Fusionspartner gewählt, da diese Fusion die Renaturierung von Proteinen begünstigen kann (Kong und Guo, 2011). SUMO-fusionierte Proteine haben ein verändertes Laufverhalten in einer SDS-PAGE (Butt et al., 2005). Obwohl His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 eine berechnete Masse von etwa 93 kDa besitzt, wurde eine starke Bande auf einer Höhe von etwa 130 kDa detektiert (Abbildung 12A). Aufgrund der Abundanz im SDS-PAGE-Gel und der später detektierten enzymatischen Aktivität, wurde davon ausgegangen, dass es sich um das gewünschte Vollängenprotein handelte.

Die Renaturierung eines solubilisierten denaturierten Proteins kann durch Dialyse bei diversen Pufferbedingungen erfolgen. Bei den hier untersuchten Bedingungen für die Renaturierung von His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 war zu erkennen, dass mit steigender NaCl-Konzentration der Anteil des löslichen Proteins zunahm (Abbildung 12A). Da ein hoher Anteil an NaCl die Bildung unlöslicher Partikel zu unterdrücken scheint, ist anzunehmen, dass die zuvor beobachtete Aggregation der PI4P 5-Kinasen durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen wird, da ionische Puffer diese Kräfte schwächen. Die Absorptionsspektren zeigten nach der Renaturierung ein Plateau zwischen 250 nm und 280 nm (Abbildung 12B), was darauf hindeutet, dass weiterhin Nukleinsäuren am Protein binden. Möglicherweise sind Nukleinsäuren bei der Faltung notwendig, um eine native Struktur von PI4P 5-Kinasen zu generieren.

Als Renaturierungshelfer kann L-Arginin in hoher Konzentration eingesetzt werden. L-Arginin unterbindet Aggregation, indem Proteine durch Anlagerung in Lösung stabilisiert werden (Baynes et al., 2005). Über ionische Bindungen von L-Arginin an das faltende Protein werden intermolekulare Protein-Protein-Interaktionen herabgesetzt und damit die Aggregation konzentrierter Proteine unterbunden (Schneider et al., 2011). In Interaktionsexperimenten von Proteinen an feste hydrophobe Oberflächen konnte außerdem gezeigt werden, dass L-Arginin auch diese Interaktion schwächen kann (Shikiya et al., 2013). Da die Seitenkette von L-Arginin sowohl hydrophobe als auch basisch-ionische Eigenschaften besitzt, können offensichtlich beide Wechselwirkungen verhindert werden. Die genauen physikalischen

Hintergründe der effizienten Verhinderung der Proteinaggregation durch L-Arginin sind bisher nicht komplett verstanden. Bei der Renaturierung von His<sub>6</sub>-SUMO-PIP5K6 mit L-Arginin war der Anteil des löslichen Proteins am höchsten, was die aggregationsunterbindenden Eigenschaften von L-Arginin für die untersuchten PI4P 5-Kinasen bestätigt (Abbildung 12A).

Der Renaturierungserfolg wurde mittels Aktivitätstests geprüft. Da Produktbanden in der Dünnschichtchromatographie detektiert wurden, folgt, dass die Renaturierung zu einer nativgefalteten katalytischen Domäne geführt hat. Aufgrund der Unsicherheit der Konzentrationsbestimmung für die nativ angereicherten Protein-Spezies und der insgesamt geringen Konzentration der renaturierten Proteine, konnte die prozentuale Aktivität des renaturierten Proteins im Vergleich zur nativen Spezies nicht bestimmt werden. Die Renaturierung von His<sub>6</sub>-SUMO-PIP6 mit 1 M L-Arginin führte zum größten Anteil löslichen Proteins im SDS-PAGE-Gel im Vergleich zu den anderen Bedingungen, jedoch zeigte diese Proteinlösung keinerlei enzymatische Aktivität. Es ist denkbar, dass aufgrund der interaktionsstörenden Eigenschaften von L-Arginin der Kontakt zwischen Enzym und Substrat unterbunden wird.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Renaturierung solubilisierter pflanzlicher PI4P 5-Kinasen aktive rekombinante Enzyme bereitstellen kann. Zukünftig sollten die Bedingungen für die Renaturierung weiter optimiert werden, so dass angereicherte und möglichst homogene Proteinlösungen generiert werden, wie sie für strukturelle Analysen nötig sind. Da die Renaturierung mit L-Arginin zu hohen Mengen an PI4P 5-Kinase führte, wäre eine Möglichkeit nach erfolgter Renaturierung weitere Schritte zur Entfernung des Additivs durchzuführen, wie Dialyse oder Größenausschlusschromatographie. Die durch Denaturierung und Renaturierung erhaltenen Protein-Präparationen waren Grundlage der weiteren funktionalen Untersuchungen dieser Arbeit.

### **5.3 Interaktion zwischen Myosinen der Klasse VIII und PI4P 5-Kinasen**

Die Interaktion von PI4P 5-Kinasen mit Myosinen wurde anfangs über einen Hefe-Zwei-Hybrid-Test untersucht. Hierbei wurden die C-terminalen Fragmente diverser Myosine aus *A. thaliana* untersucht. Wie bei anderen Studien von Myosinen der Klassen II und V (Santiago et al., 2016; Dolce et al., 2019) wurden im Rahmen dieser Arbeit C-terminale Fragmente von Myosinen der Klasse VIII untersucht. Da die Motorregion der Myosine eine separate Domäne darstellt, sollte auch bei den verwendeten C-terminalen Proteinfragmenten eine native Faltung

erfolgen. Zur Kontrolle wurde die Interaktion der Motordomänen von Myosin VIII-A, XI-2 und XI-I, bzw. das komplette Myosin ATM1 im Hefe-Zwei-Hybrid-Test mit PIP5K2 überprüft (Abbildung 31). Dabei war keine Interaktion der Motordomänen mit PIP5K2 zu erkennen. Der N-Terminus der Myosine der Klasse VIII und XI besteht aus der konservierten Motordomäne, die für ihre Aktinbindung und ATPase-Aktivität bekannt ist und aus einer SH3-ähnlichen Domäne, deren Funktion noch ungeklärt ist. Aufgrund anderer Beobachtungen mit SH3/SH3-ähnlichen Domänen könnte zwar eine Proteinbindung möglich sein (Kurochkina und Guha, 2013), scheinen jedoch nicht mit der Interaktion mit den PI4P 5-Kinasen in Verbindung zu stehen.

Das komplette Myosin ATM1 mit Motor-, IQ- und C-terminaler Domäne zeigte ebenfalls im Hefe-Zwei-Hybrid-System keine Interaktion mit PIP5K2. Dies steht im Widerspruch zum Interaktionstest mit dem C-Terminus von ATM1 und es ist denkbar, dass eventuell das Volllängenmyosin mit der Nub-Fusion weniger stark oder gar nicht in Hefe exprimiert wird und dadurch keine Interaktion und somit keine Freisetzung der Transkriptionsfaktoren stattfinden kann. Weiterhin ist ebenfalls die Möglichkeit vorhanden, dass trotz Expression der Gene keine Interaktion stattfinden kann, weil diese sich an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle befinden. Während PIP5K2 aufgrund der Ost4-Fusion an der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert, ist es möglich, dass das Myosin so stark an Aktin bindet, dass die Proteine keine Möglichkeit zur Interaktion haben. Ein weiteres Problem könnte sein, dass ein Volllängenmyosin Einfluss auf die Physiologie der Hefezellen haben könnte. Je nachdem, in welchem Maß das Protein in den Zellen zu finden ist, kann es sein, dass die Expression des Myosins oder auch der PI4P 5-Kinase für die Hefezellen letal ist.

Die Analyse der C-terminalen Fragmente der Myosine zeigte im Interaktionstest mit PIP5K2 eindeutiges Wachstum bei Myosinen der Klasse VIII, aber nicht mit Klasse XI im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 14, links). Die Interaktion von PIP5K2 mit dem C-terminalen Fragment des Myosins ATM2 konnte durch einen *pull-down*-Test unterstützt werden (Abbildung 21). Der Hefe-Zwei-Hybridtest mit PIP5K6 zeigte kein maßgebliches Wachstum sowohl bei kotransformierten Hefezellen mit Myosinen der Klasse VIII als auch der Klasse XI (Abbildung 14, rechts). Aus diesem Grund ist die Interpretation im Sinne einer Interaktion kaum möglich. Da nicht ersichtlich ist, wie der physiologische Zustand der Hefezellen nach der Transformation konkret ist, was die Analyse erschweren kann. Aufgrund des *pull-down*-Tests scheint PIP5K6 trotzdem mit Myosinen der Klasse VIII zu interagieren (Abbildung 21). Auch der Aktivitätstest von PIP5K6 zeigte einen Einfluss sowohl von ATM2 als auch von VIII-B auf die enzymatische Aktivität von PIP5K6 *in vitro*, was eine funktionale

Interaktion anzeigt (Abbildung 25B). Es wurden auch andere PI4P 5-Kinasen auf Interaktion mit Myosinen aus *A. thaliana* getestet (Abbildung 30). Dabei zeigten PIP5K9 und PIP5K10 ein ähnliches Interaktionsverhalten zeigen wie PIP5K6. Eine mögliche Interaktion der PI4P 5-Kinasen mit Myosinen ist daher nur schwer interpretierbar. Im Gegensatz dazu zeigten PIP5K1 und PIP5K11 deutliches Wachstum der Hefezellen, was auf Interaktion mit Myosinen der Klasse VIII deutet. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl pflanzliche PI4P 5-Kinasen als auch Myosine der Klasse VIII an der Plasmamembran lokalisieren, ist eine Interaktion physiologisch möglich. Interessanterweise besitzen PIP5K10 und PIP5K11 keine MORN-Domäne, die basierend auf der Kristallstruktur vom menschlichen Myosin der Klasse III mit einem MORN-Protein aus Maus (Li et al., 2019) als mögliche Interaktionsstelle in Frage kommt. Es ist daher denkbar, dass zusätzliche Bindestellen vorliegen könnten, mglw. in der variablen Insertregion der katalytischen Domänen von PIP5K10 oder PIP5K11. Unter Verwendung verkürzter Varianten von PIP5K2 wurde versucht eine Interaktionsregion näher einzugrenzen (Abbildung 15). Die Interaktionsstelle scheint im Bereich an der Dimerisierungsdomäne zur Linkerregion zu sein. Aufgrund der konservierten Aminosäuresequenz der Dimerisierungsdomäne könnte also eine Interaktion aller PI4P 5-Kinasen zu Myosinen der Klasse VIII möglich sein. Die variablen Linkerregionen könnten dabei unterschiedliche Affinitäten zu den Proteinen hervorrufen. Möglicherweise ist daher das Wachstum der Hefezellen mit unterschiedlichen PI4P 5-Kinasen im Hefe-Zwei-Hybrid-Test so variabel.

Die Interaktion müsste mit weiteren Tests validiert werden. Eine Möglichkeit wäre mithilfe einer *Crosslinking*-Reaktion beide Proteine in einer Lösung zu verknüpfen und mithilfe von Massenspektrometrie zu analysieren. Dabei könnten zusätzlich nähere Informationen zum genauen Bereich der Interaktion der Proteine gewonnen werden. Für diesen experimentellen Ansatz sind jedoch homogene Proteinspezies notwendig, die bisher nicht generiert werden konnten. Die obengenannte Optimierung der Renaturierung der PI4P 5-Kinasen und Myosine wäre von Vorteil, um diese wichtigen Experimente in Zukunft durchführen zu können.

Darüber hinaus könnte die Interaktion weiter charakterisiert werden. Mithilfe einer isothermen Titrationskalorimetrie könnten u.a. Bindungsaffinitäten ermittelt und die Interaktionen verschiedener Myosine mit diversen PI4P 5-Kinasen besser verstanden werden. Dafür werden jedoch hohe Mengen an homogenen Proteinspezies benötigt.

#### 5.4 *In vitro* Charakterisierung von Myosin ATM1, ATM2 und VIII-B

Pflanzliche Myosine der Klasse VIII wurden bisher mithilfe von Lokalisationsstudien *in vivo* beschrieben und für biochemische Analysen wurde die Motordomäne separat betrachtet (Reichelt et al., 1999; Golomb et al., 2008; Sattarzadeh et al., 2008; Haraguchi et al., 2014). In dieser Arbeit wurden nach meiner Kenntnis erstmals die C-terminalen Bereiche der Klasse VIII-Myosine ATM1, ATM2 und VIII-B *in vitro* auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht. Bei der nativen Anreicherung des C-Terminus von ATM1 wurde ersichtlich, dass Myosine der Klasse VIII ebenso wie schon die PI4P 5-Kinasen in Lösung zur Aggregation neigen und nur mittels Hochsalzbedingungen im Vergleich zu Niedrigsalzbedingungen stabil blieben (Abbildung 17). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Proteine eine hohe Anfälligkeit gegenüber Proteasen haben müssen, da bei verschiedenen Analysen wie AUZ keine präzisen Auswertungen gemacht werden konnten, da die Proteine in Lösung selbst bei Zugabe von Protease-Inhibitoren nicht stabil waren.

Die Reinigung von Klasse VIII Myosinen erfolgte ebenfalls über denaturierende Anreicherung und nachfolgende Renaturierung der Proteine. Da die C-terminalen Myosin-Bereiche keine enzymatische Aktivität haben, musste der Erfolg der Renaturierung mittels Strukturanalysen wie CD-Spektroskopie und spezifische Lipid-Bindungseigenschaften erfolgen. Algorithmen zur Vorhersage von Sekundärstrukturen weisen darauf hin, dass Myosine der Klasse VIII im C-terminalen Bereich einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helices haben, die wahrscheinlich eine sog. *coiled coil*-Region bilden (Simm et al., 2015). *Coiled coil*-Regionen in Proteinen sind stabile Sekundärstrukturen, bei der mindestens zwei  $\alpha$ -Helices umeinandergewunden sind und dienen häufig der Interaktion mit Proteinen oder anderen gebundenen Strukturen. Die Sekundärstruktur der rekombinant erzeugten C-terminalen Fragmente von ATM2 und VIII-B konnte mit CD-Spektroskopie untersucht werden. Dabei wurde ein Doppelminimum (bei 208 nm und 222 nm) detektiert, wie es für  $\alpha$ -helikale Strukturen typisch ist. Dies entspricht der Erwartung einer weitgehend  $\alpha$ -helikalen Struktur, ist allein aber nicht ausreichend, um eine native Struktur nachzuweisen. Eine weitere Idee war es, den Oligomerisierungszustand der Proteine mithilfe von AUZ zu analysieren. Da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass die *coiled coil*-Regionen sich unter anderem in Abhängigkeit vom umgebenden pH-Wert bilden (Dutta et al., 2001; Steinmetz et al., 2007), sollte eine Abhängigkeit der Oligomerisierung vom pH-Wert ermittelt werden. Dazu wurden die Proteine über Nacht renaturiert und anschließend in Puffern mit verschiedenen pH-Werten dialysiert (3.3.6). Die AUZ-Messungen wurden dann für mehrere Tage bei 20 °C

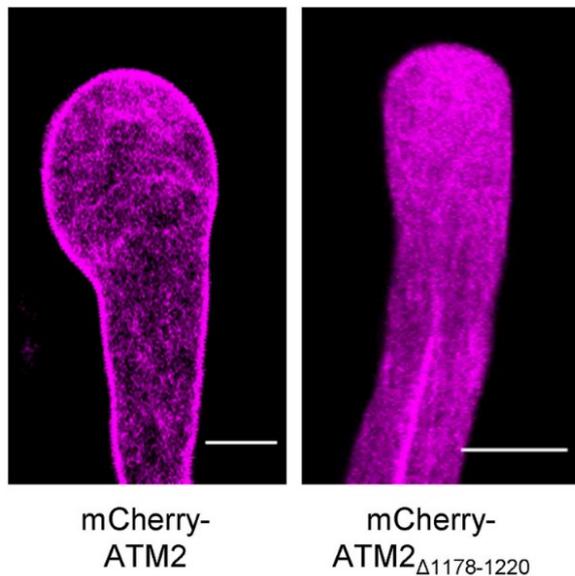
durchgeführt (3.4.3). Leider konnten trotz guter Datenqualität keine logischen Daten zum Oligomerisierungsgrad berechnet werden, da die ermittelten Molekülgrößen weder zu monomeren, noch zu höheren oligomeren Spezies gepasst haben. Nachdem die Messung durchgeführt wurde, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 34) und es ist erkennbar, dass die verwendeten Proteine progressiv zu kleineren Fragmenten abgebaut wurden. Unterschiedliche pH-Werte haben dabei unterschiedliche Anteile an Fragmenten hervorgebracht und es ist denkbar, dass die relevanten Proteasen bei unterschiedlichen pH-Werten verschieden aktiv sind. Das zeigt, dass trotz Renaturierung die Proteine weiterhin anfällig für Proteasen sind und dadurch weitere Analysen erschwert werden. Daher wurden für weitere Experimente mit Myosinen die Proteine immer frisch renaturiert und sofort verwendet.

## 5.5 Lipidbindung der Myosine der Klasse VIII

Weitere Analysen zeigten, dass Myosine der Klasse VIII anionische Phospholipide und besonders Phosphoinositide (PIs) binden. Die Lipidbindung wurde durch verschiedene Verfahren, unter anderem *Lipid-overlay*- und Liposomen-Sedimentations-Tests nachgewiesen (Abbildung 23 und Abbildung 24). Dies ist die erste Beschreibung einer möglichen Funktion der C-terminalen Regionen pflanzlicher Myosine der Klasse VIII mithilfe von *in vitro* Experimenten. Die Fusionen der letzten 46 bis 57 Aminosäuren der Myosine an GST waren dabei hinreichend für die Lipidbindung. Diese Bindung scheint nicht ausschließlich auf der Ladung der Lipide zu beruhen, da die negativ geladene Phosphatidsäure nicht gebunden wurde. Die renaturierten C-terminalen Fragmente von ATM2 und VIII-B zeigten ein gleiches Bindungsmuster wie die GST-fusionierten polybasischen Regionen allein (Abbildung 23 und Abbildung 24). Die Lipidbindung scheint weiterhin unabhängig von der verwendeten Fusion über die letzten C-terminalen Aminosäuren hervorgerufen zu werden.

Die Lipidbindung wurde u.a. mit einem Liposomen-Sedimentationstest verifiziert. Dabei wird eine einer natürlichen Membran ähnliche *in vitro*-Situation der Lipidbindung simuliert. Die leicht unterschiedlichen Ergebnisse der Liposomen-Sedimentationstests im Vergleich zum *Lipid-overlay*-Test können verschiedene Gründe haben. Zum einen handelt es sich um qualitative und nicht um quantitative Tests. Da Liposomen eher die natürliche Umgebung simulieren als die getropften Lipide auf der Nitrozellulosemembran, könnte die Aussagekraft des Liposomen-Sedimentationstests demnach höher sein. Dabei wird deutlich, dass besonders PI4P und PI(4,5)P<sub>2</sub> sowohl von ATM2 als auch von VIII-B gebunden wurden (Abbildung

24B). Um die Lipidbindung im biologischen System zu verifizieren, wurden von Vera Wagner (MLU Halle-Wittenberg, Abt. Pflanzenbiochemie) *in vivo* Experimente zur Lipidbindung von ATM2 an die Plasmamembran von Pollenschläuchen durchgeführt. Dabei wurde zum einen ATM2 (ohne SH3-ähnliche Domäne) und zum anderen ATM2 ohne polybasische Region mit N-terminalen mCherry in Tabak-Pollenschläuche transformiert und anschließend die subzelluläre Lokalisation mikroskopisch analysiert (Kastner et al., 2022; Vera Wagner und Ingo Heilmann, MLU Halle-Wittenberg, unveröffentlicht).



**Abbildung 26: Der C-terminale Bereich von ATM2 ist notwendig für die Assoziation mit der Plasmamembran.** Es wurden zwei Varianten vom Myosin ATM2 aus *A. thaliana* (links, komplettes Myosin; rechts, trunkierte Variante ATM2<sub>Δ1178-1220</sub>) in Tabakpollenschläuche exprimiert und die subzelluläre Verteilung mittels konfokaler Laserrastermikroskopie untersucht. Maßstab, 10  $\mu$ m. Das Experiment wurde von Vera Wagner durchgeführt. Das Bild wurde modifiziert nach Kastner et al., 2022.

Dabei wurde das vollständige Myosin überwiegend an die Plasmamembran assoziiert detektiert, während die verkürzte Variante keine Plasmamembran-Assoziation zeigte und stattdessen im Zytosol lokalisierte. Kein anderer Bereich im Myosin kompensierte also die fehlende Bindung an PIs, die offenbar für die Plasmamembran-Assoziation nötig war. Weitere Experimente bestätigen diesen Befund und die Expression der Phosphoinositidphosphatase SAC9 (Williams et al., 2005; Rausche et al., 2021) bewirkte eine stark verminderte Plasmamembran-Assoziation einer Vollängen-ATM2-Fusion, obwohl dieses Protein eine intakte Lipid-Binderegion besaß (Vera Wagner und Ingo Heilmann, unveröffentlicht). Die Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der *in vitro* generierten Daten zur Lipidbindung der Myosine der Klasse VIII. Verglichen mit anderen Lokalisationsstudien (Golomb et al., 2008; Ryan und Nebenführ, 2018), könnte die Plasmamembran-Assoziation der Myosine der Klasse VIII also von der Bindung an PIs abhängen. Als aktinbindende Proteine könnten Myosine

somit eine Verbindung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett herstellen. Da die pflanzlichen Myosine der Klasse VIII bisher nur mit der Assoziation an Membranen in Verbindung gebracht wurden (Ryan und Nebenführ, 2018), stellt sich die Frage, welche biologische Relevanz die Interaktion der Myosine mit Signallipiden hat. PIs sind dafür bekannt, einen wichtigen Einfluss auf die Regulation physiologischer Prozesse zu haben (Heilmann und Heilmann, 2015; Jaillais und Ott, 2020). Solche Mechanismen erfolgen unter anderem durch die Rekrutierung von Proteinen an Membran-Nanodomänen, in denen PIs angereichert vorliegen. Bislang sind die zugrundeliegenden molekularen Vorgänge solcher Proteinrekrutierung nicht komplett geklärt. Myosine der Klasse VIII stellen durch ihre Bindung an PIs damit weitere Faktoren zum besseren Verständnis für die Regulation physiologischer Prozesse in Pflanzen dar. ATM2 beeinflusst bspw. die Endozytose an der Plasmamembran (Sattarzadeh et al., 2008), in ähnlicher Weise wie die Endozytose auch über PIs reguliert wird (König et al., 2008; Zhao et al., 2010; Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014; Hempel et al., 2017; Menzel et al., 2019). Die Bindung von ATM2 an PIs könnte damit eine wichtige Verbindung zwischen Plasmamembran, dem Aktin-Zytoskelett und der Endozytose darstellen, erfordert jedoch weitere Versuche zum besseren Verständnis. Es könnten z.B. weitere mikroskopische Versuche mit der verkürzten Variante des ATM2 durchgeführt werden, bei denen zusätzlichen Indikatoren von der Endozytose untersucht werden. Weiterhin könnte die Endozytose-Rate bei Myosin-*knockout* Pflanzen bestimmt werden.

Neben der Bindung an PIs war auffällig, dass die lipidbindenden Regionen der pollenspezifischen Myosine ATM2 und VIII-B zusätzlich Phosphatidylserin binden, während die ubiquitär exprimierten Myosine ATM1 und VIII-A dieses Lipid nicht zu binden schienen. Es wurde experimentell ermittelt, dass Phosphatidylserin an der Stabilisierung der pflanzlichen GTPase *Rho of plants 6* (ROP6) an der Plasmamembran beteiligt ist, das als Signalfaktor eine wichtige Rolle bei pflanzlichen Entwicklungsprozessen spielt (Platre et al., 2019; Colin und Jaillais, 2020). Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts an der Plasmamembran pflanzlicher Zellen wird durch ein komplexes Netzwerk an verschiedenen Proteinen beeinflusst und ist noch nicht komplett verstanden. Rho-GTPasen haben aber auch einen wichtigen Einfluss bei der Dynamik im Aktin-Zytoskelett (Kost et al., 1999; Kost, 2008; Ischebeck et al., 2011; Fratini et al., 2021), wodurch sich eine weitere mögliche Verbindung zu den pollenspezifischen Myosinen der Klasse VIII aus *A. thaliana* ergibt.

Zukünftig sollte die Lipidbindung weiter charakterisiert werden. Eine Möglichkeit dazu ist die Analyse mittels *microscale thermophoresis*, bei der die Fluoreszenzabhängigkeit eines

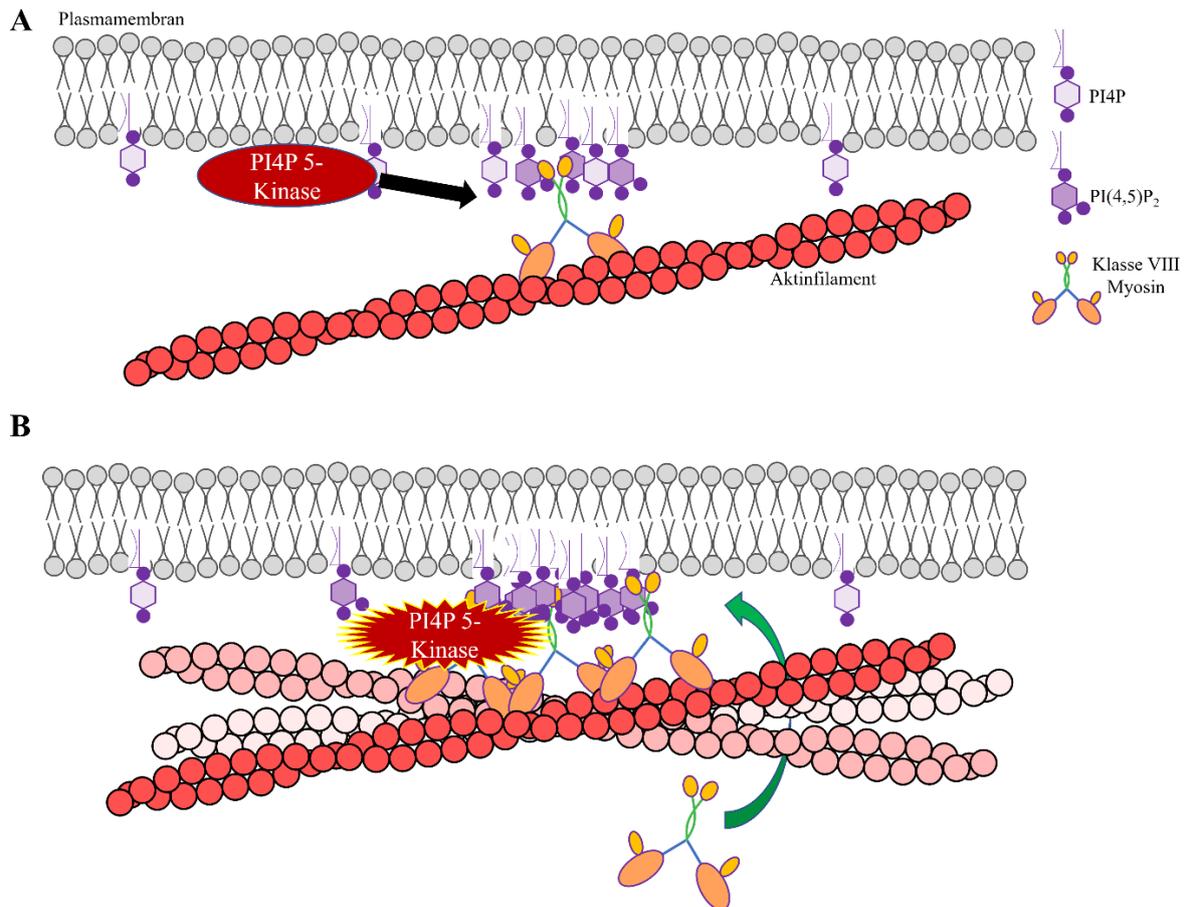
markierten Myosins in Abhängigkeit von der Liposomenkonzentration gemessen werden kann, um quantitative Daten zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten zu ermitteln.

## **5.6 Myosine der Klasse VIII als Modulatoren der enzymatischen Aktivität pflanzlicher PI4P 5-Kinasen in der Aktinregulation**

Im Zuge der biochemischen *in vitro* Charakterisierung der Myosine der Klasse VIII wurde eine Aktivierung der enzymatischen Aktivität von PI4P 5-Kinasen in Anwesenheit der Myosine beobachtet (Abbildung 25). Dabei wurden sowohl MBP-PIP5K2 als auch MBP-PIP5K6 entweder mit der gleichen Massenkonzentration an Lysozym bzw. der Myosine inkubiert und auf die Aktivität der PI4P 5-Kinasen getestet. Der Versuchsansatz vermied dabei mögliche Effekte von *macromolecular crowding*. Dabei handelt es sich um ein Phänomen, bei dem sich die Eigenschaften von Proteinen in Anwesenheit hoher Proteinkonzentrationen verändern können (Ellis, 2001). Es befindet sich unter Umständen *in vivo* eine hohe lokale Konzentration verschiedener Proteine. Durch die gleiche Menge der Bindungspartner wurde ausgeschlossen, dass die enzymatische Aktivität der PI4P 5-Kinasen von der unmittelbaren Proteinkonzentration abhängig ist.

Während im Mittel der durchgeführten Experimente für MBP-PIP5K2 nur eine nicht signifikante, tendenzielle Aktivitätssteigerung erkennbar war, war die enzymatische Aktivität von MBP-PIP5K6 in Anwesenheit der Myosin-Fragmente signifikant erhöht. Diese Experimente müssten validiert werden und im Idealfall sollten dazu renaturierte Proteine ohne messbare Verunreinigungen verwendet werden, um die Fehlerquellen zu minimieren. Da die untersuchten Myosine sowohl Substrat als auch Produkt der Lipidkinase-Reaktion binden, könnte dies einen Einfluss auf die Katalyse haben. So wäre eine Möglichkeit, dass durch die Bindung der Myosine an  $PI(4,5)P_2$ , dem Produkt der Reaktion, eine eventuelle Produktinhibierung der PI4P 5-Kinasen unterbunden werden könnte. Dabei wäre aber eine direkte Interaktion beider Proteine, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, nicht gezwungenermaßen notwendig. Es konnte von Katharina Gerth gezeigt werden, dass das Protein *ROP2*, das ebenfalls  $PI(4,5)P_2$  bindet, bei äquimolarer Applikation keinen Einfluss auf die Aktivität von PIP5K2 hat (Katharina Gerth, unveröffentlicht). Dieser Befund weist darauf hin, dass die Bindung von Proteinen an  $PI(4,5)P_2$  keinen direkten Einfluss auf die PI4P 5-Kinase-Aktivität haben muss. Daher wäre also eine andere Möglichkeit, dass Myosine über einen direkten Kontakt zur PI4P 5-Kinase einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität ausüben und die Lipidbindung für ihre Lokalisation notwendig sein könnte. Eine in

Anwesenheit der Klasse VIII-Myosine erhöhte PI4P 5-Kinase-Aktivität würde *in vivo* somit die Produktion von PI(4,5)P<sub>2</sub> fördern, was wiederum eine vermehrte Rekrutierung von Myosinen an die Plasmamembran begünstigt, wodurch wieder die Lipidkinase-Aktivität steigt. Sollten sich die experimentellen Befunde bestätigen ergibt sich ein positiver Rückkopplungseffekt, der mglw. zu einem selbstverstärkenden Mechanismus beiträgt, durch den die Anheftung von Aktin-Filamenten und die PI(4,5)P<sub>2</sub>-Nanostruktur der Plasmamembran einander beeinflussen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Modell zur selbstamplifizierenden Schleife von Myosinen der Klasse VIII an die Plasmamembran.** An einer Plasmamembran befinden sich neben Strukturlipiden auch Signallipide, die u.a. in Form von Nanodomänen organisiert sind. Diese können von verschiedenen membranassoziierten Proteinen gebunden werden (nicht maßstabsgetreu). **A)** Myosine der Klasse VIII binden über ihren C-Terminus an anionische Phospholipide in der Plasmamembran. Über ihre N-terminale Motordomäne sind sie an Aktinfilamenten gebunden, wodurch eine Interaktion des Zytoskeletts mit der Plasmamembran vermittelt werden kann. Membranassoziierte PI4P 5-Kinasen, die sich auch in Nanodomänen befinden, rekrutieren an Myosine, wodurch beide Proteine interagieren können. **B)** Die Interaktion einer PI4P 5-Kinase mit Myosinen erhöht ihre Lipidkinase-Aktivität. Dadurch wird mehr PI(4,5)P<sub>2</sub> an der Plasmamembran angereichert, wodurch mehr Myosine rekrutiert werden (grüner Pfeil). In dieser selbstamplifizierenden Schleife können mehr Aktinfilamente an die Plasmamembran assoziieren und die Stabilität des Zytoskeletts erhöht werden.

Im vorgeschlagenen Modell findet eine Interaktion von PI4P 5-Kinasen mit Myosinen der Klasse VIII an der Plasmamembran statt. Es ist möglich, dass die Myosine trotz ihrer schwachen Motoraktivität über Aktinfilamente an die Plasmamembran gelangen und dadurch

an Nanodomänen binden können, wo bereits PI4P 5-Kinasen lokalisieren. Es könnte aber auch erst dann eine Aktinbindung stattfinden, wenn Myosine an anionische Phospholipide gebunden vorliegen. Grundsätzlich lokalisieren Myosine der Klasse VIII letztlich an der Plasmamembran (Golomb et al., 2008; Avisar et al., 2009). In Abbildung 27A wird die Möglichkeit dargestellt, dass eine PI4P 5-Kinase von einem Myosin rekrutiert wird. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Myosine von PI4P 5-Kinasen rekrutiert werden. Dies wäre von der Mobilität der Proteine an einer Membran abhängig.

Die Interaktion der Proteine sorgt in jedem Fall für eine Steigerung der enzymatischen Aktivität der PI4P 5-Kinase. Dadurch wird mehr PI(4,5)P<sub>2</sub> synthetisiert, wodurch wiederum neue Bindestellen für Myosine entstehen. Diese interagieren mit PI4P 5-Kinasen, deren Aktivität wieder gesteigert wird (Abbildung 27B). Dieser positive Rückkopplungseffekt kann als selbstamplifizierende Schleife bezeichnet werden. Dadurch wird die lokale Konzentration von Myosinen der Klasse VIII an der Plasmamembran gesteigert. Durch die hohe Affinität dieser Myosine für Aktin (Haraguchi et al., 2014) würden so Aktinfilamente an der Plasmamembran fixiert und weitere PI(4,5)P<sub>2</sub>-bindende Faktoren wie ROPs rekrutiert werden, was eine Stabilisierung des Zytoskeletts zur Folge haben würde. Eine stabilisierende Wirkung von PIP5K2 auf die Aktindynamik in Pflanzen wurde bereits zuvor beschrieben (Fratini et al., 2021). Das hier präsentierte Modell beschreibt einen möglichen molekularen Mechanismus, der der Stabilisierung von Aktin-Filamenten zugrunde liegen könnte. Das Modell wird durch zellbiologische Untersuchungen von Vera Wagner (MLU Halle-Wittenberg, Abt. Pflanzenbiochemie) gestützt, die mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* zeigte, dass die Expression von ATM2 mit fehlender Lipidbindung die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts vermindert (Vera Wagner und Ingo Heilmann, unveröffentlicht). Außerdem war der stabilisierende Einfluss auf das Signallipid PI(4,5)P<sub>2</sub> zurückzuführen (Vera Wagner und Ingo Heilmann, MLU-Halle-Wittenberg, unveröffentlicht).

Es bleibt einschränkend anzumerken, dass *in vitro* v.a. PIP5K6 in Anwesenheit von Myosinen der Klasse VIII eine signifikant höhere enzymatische Aktivität aufwies (Abbildung 25B), ein Enzym, das in vorangegangenen Arbeiten keinen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett zeigte (Fratini et al., 2021). Folglich sollte bei dieser Interaktion ebenfalls eine Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts stattfinden. Dies wurde allerdings bisher nicht beobachtet (Stenzel et al., 2012). Möglicherweise könnte die erhöhte Konzentration von PI(4,5)P<sub>2</sub> aufgrund der vorliegenden Interaktion andere physiologische Effekte haben.

Da nur die C-Termini der Myosine untersucht wurden, kann weiterhin momentan nicht beurteilt werden, ob PI4P 5-Kinasen auch einen Einfluss auf ATPase-Aktivität, Geschwindigkeit oder Prozessivität der Motordomäne der betrachteten Myosine haben.

Trotz dieser Einschränkung eröffnet die neu beschriebene Interaktion von Myosinen der Klasse VIII mit PI4P 5-Kinasen neue Wege zum Verständnis der Regulation und Stabilisierung von Aktinfilamenten. Insbesondere kann das Zusammenspiel von Plasmamembran und Zytoskelett durch die neu beschriebenen Eigenschaften der Myosine der Klasse VIII nun besser verstanden werden und ermöglicht neue Einblicke in die molekulare Funktion dieser bislang enigmatischen Myosinklasse.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Einflüsse der Interaktion von PI4P 5-Kinasen aus *A. thaliana* mit Partnerproteinen auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Dazu sollten PI4P 5-Kinasen rekombinant hergestellt, angereichert und Bedingungen gefunden werden, bei denen strukturelle Analysen möglich sind. Die Bereitstellung der rekombinanten Proteine für die Analysen stellte eine besondere Herausforderung dar und wurde durch denaturierende Solubilisierung mit anschließender Renaturierung der Proteine erreicht. Die Qualität der rekombinanten Proteine ist allerdings nach wie vor suboptimal und bedarf weitergehender Optimierung.

Auf der Grundlage der Kristallstruktur des Komplexes eines murinen MORN-Proteins mit einem humanen Fragment eines Myosins der Klasse III (Li et al., 2019) wurde die Hypothese aufgestellt, dass PI4P 5-Kinasen aus *Arabidopsis* ebenfalls mit Myosinen interagieren könnten. Im Zentrum der Analysen stand daher der Befund, dass PI4P 5-Kinasen mit enigmatischen Myosinen der Klasse VIII interagieren, einer Familie aktinbindender Proteine von bislang nur schlecht definierter Funktion. Die C-terminalen Fragmente der Klassen VIII-Myosine ATM2 und VIII-B aus *A. thaliana* wurden erstmals rekombinant exprimiert, denaturierend angereichert und renaturiert. Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine zeigt, dass Myosine der Klasse VIII v.a. mit der PI4P 5-Kinase PIP5K2 interagieren. Dies ist interessant, weil beide Proteine das Aktin-Zytoskelett beeinflussen. Es wird weiterhin gezeigt, dass Myosine der Klasse VIII über eine polybasische Region am extremen C-Terminus anionische Phospholipide, v.a. Phosphoinositide, wie PI(4,5)P<sub>2</sub>, dem Reaktionsprodukt von PIP5K2 binden können. Die pollenspezifischen Myosine ATM2 und VIII-B banden zusätzlich an Phosphatidylserin. Die renaturierten Myosine der Klasse VIII lagen in erwarteter  $\alpha$ -helikaler Struktur vor und hatten neben ihren lipidbindenden Eigenschaften zusätzlich einen positiven Einfluss auf die enzymatische Aktivität der PI4P 5-Kinasen PIP5K2 und PIP5K6. Weitere Analysen der C-terminalen Fragmente der Klasse VIII-Myosine waren aufgrund von proteolytischer Anfälligkeit und der Neigung zur Aggregation bei verschiedenen Bedingungen nicht möglich und bedürfen weiterer Optimierungen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten begründen eine neue Arbeitshypothese zur Rolle von Phosphoinositiden der Plasmamembran bei der Regulation der Membran-proximalen Zytoskelettdynamik. Nach dieser Hypothese bewirkt die PI(4,5)P<sub>2</sub>-abhängige Rekrutierung von Myosinen der Klasse VIII einerseits eine Anheftung von Aktin-Filamenten an

Plasmamembran-Nanodomänen, die vermehrt PI(4,5)P<sub>2</sub> enthalten. Andererseits fördert die Bindung der Myosine an diese Nanodomänen dort die Aktivität von PIP5K2 und die vermehrte Bildung von PI(4,5)P<sub>2</sub>, so dass wieder mehr Myosine und Aktinfilamente rekrutiert werden können. Die so beschriebene wechselseitige Interaktion weist auf einen selbsterhaltenden Prozess bei der Interaktion von Aktin-Zytoskelett und Plasmamembran hin, der in der Zukunft v.a. durch zellbiologische Ansätze näher untersucht werden muss.

## 7 Literaturverzeichnis

**Aschenbrenner L, Naccache SN, Hasson T (2004):** Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Molecular biology of the cell* 15: 2253–2263.

**Avisar D, Abu-Abied M, Belausov E, Sadot E, Hawes C, Sparkes IA (2009):** A comparative study of the involvement of 17 Arabidopsis myosin family members on the motility of Golgi and other organelles. *Plant physiology* 150: 700–709.

**Baynes BM, Wang DIC, Trout BL (2005):** Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* 44: 4919–4925.

**Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013):** Lipide und Zellmembranen. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (Hrsg.), *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 348–373.

**Boss WF, Im YJ (2012):** Phosphoinositide signaling. *Annual review of plant biology* 63: 409–429.

**Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254.

**Brzeska H, Guag J, Remmert K, Chacko S, Korn ED (2010):** An experimentally based computer search identifies unstructured membrane-binding sites in proteins: application to class I myosins, PAKS, and CARMIL. *The Journal of biological chemistry* 285: 5738–5747.

**Burden LM, Rao VD, Murray D, Ghirlando R, Doughman SD, Anderson RA, Hurley JH (1999):** The flattened face of type II beta phosphatidylinositol phosphate kinase binds acidic phospholipid membranes. *Biochemistry* 38: 15141–15149.

**Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR (2005):** SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification* 43: 1–9.

**Cacas J-L, Furt F, Le Guédard M, Schmitter J-M, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule J-J, Simon-Plas F, Mongrand S (2012):** Lipids of plant membrane rafts. *Progress in lipid research* 51: 272–299.

**Chandra M, Chin YK-Y, Mas C, Feathers JR, Paul B, Datta S, Chen K-E, Jia X, Yang Z, Norwood SJ, Mohanty B, Bugarcic A, Teasdale RD, Henne WM, Mobli M, Collins**

**BM (2019):** Classification of the human phox homology (PX) domains based on their phosphoinositide binding specificities. *Nature communications* 10: 1528.

**Cockcroft S (2021):** Mammalian lipids: structure, synthesis and function. *Essays in biochemistry* 65: 813–845.

**Colin LA, Jaillais Y (2020):** Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Current opinion in plant biology* 53: 1–9.

**Deamer D (2016):** Membranes and the Origin of Life: A Century of Conjecture. *Journal of molecular evolution* 83: 159–168.

**Deamer D, Dworkin JP, Sandford SA, Bernstein MP, Allamandola LJ (2002):** The first cell membranes. *Astrobiology* 2: 371–381.

**Dodd MS, Papineau D, Grenne T, Slack JF, Rittner M, Pirajno F, O'Neil J, Little CTS (2017):** Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. *Nature* 543: 60–64.

**Dolce LG, Silva-Junior RMP, Assis LHP, Nascimento AFZ, Araujo JS, Meschede IP, Espreafico EM, Giuseppe PO de, Murakami MT (2019):** Myosin Va interacts with the exosomal protein spermine synthase. *Bioscience reports* 39.

**Dutta K, Alexandrov A, Huang H, Pascal SM (2001):** pH-induced folding of an apoptotic coiled coil. *Protein science : a publication of the Protein Society* 10: 2531–2540.

**Ellis RJ (2001):** Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends in biochemical sciences* 26: 597–604.

**Fratini M, Krishnamoorthy P, Stenzel I, Riechmann M, Matzner M, Bacia K, Heilmann M, Heilmann I (2021):** Plasma membrane nano-organization specifies phosphoinositide effects on Rho-GTPases and actin dynamics in tobacco pollen tubes. *The Plant Cell* 33: 642–670.

**Furt F, König S, Bessoule J-J, Sargueil F, Zallot R, Stanislas T, Noirot E, Lherminier J, Simon-Plas F, Heilmann I, Mongrand S (2010):** Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant physiology* 152: 2173–2187.

**Gerth K, Lin F, Daamen F, Menzel W, Heinrich F, Heilmann M (2017a):** Arabidopsis phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 2 contains a functional nuclear localization

sequence and interacts with alpha-importins. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 92: 862–878.

**Gerth K, Lin F, Menzel W, Krishnamoorthy P, Stenzel I, Heilmann M, Heilmann I (2017b):** Guilt by Association: A Phenotype-Based View of the Plant Phosphoinositide Network. *Annual review of plant biology* 68: 349–374.

**Golomb L, Abu-Abied M, Belausov E, Sadot E (2008):** Different subcellular localizations and functions of *Arabidopsis* myosin VIII. *BMC plant biology* 8: 3.

**Gubbels M-J, Vaishnav S, Boot N, Dubremetz J-F, Striepen B (2006):** A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *Journal of cell science* 119: 2236–2245.

**Hanczyc MM, Fujikawa SM, Szostak JW (2003):** Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, and division. *Science (New York, N.Y.)* 302: 618–622.

**Haraguchi T, Tamanaha M, Suzuki K, Yoshimura K, Imi T, Tominaga M, Sakayama H, Nishiyama T, Murata T, Ito K (2022):** Discovery of ultrafast myosin, its amino acid sequence, and structural features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119.

**Haraguchi T, Tominaga M, Matsumoto R, Sato K, Nakano A, Yamamoto K, Ito K (2014):** Molecular characterization and subcellular localization of *Arabidopsis* class VIII myosin, ATM1. *The Journal of biological chemistry* 289: 12343–12355.

**Haraguchi T, Tominaga M, Nakano A, Yamamoto K, Ito K (2016):** Myosin XI-I is Mechanically and Enzymatically Unique Among Class-XI Myosins in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 57: 1732–1743.

**Hartmann MD (2017):** Functional and Structural Roles of Coiled Coils. *Sub-cellular biochemistry* 82: 63–93.

**Heilmann I (2016):** Phosphoinositide signaling in plant development. *Development (Cambridge, England)* 143: 2044–2055.

**Heilmann M, Heilmann I (2015):** Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation. *Biochimica et biophysica acta* 1851: 759–769.

**Heilmann M, Heilmann I (2022):** Regulators regulated: Different layers of control for plasma membrane phosphoinositides in plants. *Current opinion in plant biology* 67: 102218.

- Hempel F, Stenzel I, Heilmann M, Krishnamoorthy P, Menzel W, Golbik R, Helm S, Dobritzsch D, Baginsky S, Lee J, Hoehenwarter W, Heilmann I (2017):** MAPKs Influence Pollen Tube Growth by Controlling the Formation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in an Apical Plasma Membrane Domain. *The Plant Cell* 29: 3030–3050.
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K (1995):** A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3903–3907.
- Hoepfner D, van den Berg M, Philippsen P, Tabak HF, Hettema EH (2001):** A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 155: 979–990.
- Hu J, Yuan Q, Kang X, Qin Y, Li L, Ha Y, Wu D (2015):** Resolution of structure of PIP5K1A reveals molecular mechanism for its regulation by dimerization and dishevelled. *Nature communications* 6: 8205.
- Im YJ, Davis AJ, Perera IY, Johannes E, Allen NS, Boss WF (2007):** The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. *The Journal of biological chemistry* 282: 5443–5452.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990):** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23–28.
- Ischebeck T, Stenzel I, Hempel F, Jin X, Mosblech A, Heilmann I (2011):** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65: 453–468.
- Ischebeck T, Werner S, Krishnamoorthy P, Lerche J, Meijón M, Stenzel I, Löffke C, Wiessner T, Im YJ, Perera IY, Iven T, Feussner I, Busch W, Boss WF, Teichmann T, Hause B, Persson S, Heilmann I (2013):** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25: 4894–4911.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983):** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology* 153: 163–168.

**Jaillais Y, Ott T (2020):** The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective. *Plant physiology* 182: 1682–1696.

**Jia Z, Ghai R, Collins BM, Mark AE (2014):** The recognition of membrane-bound PtdIns3P by PX domains. *Proteins* 82: 2332–2342.

**Johnsson N, Varshavsky A (1994):** Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10340–10344.

**Julkowska MM, Rankenberg JM, Testerink C (2013):** Liposome-binding assays to assess specificity and affinity of phospholipid-protein interactions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1009: 261–271.

**Kastner C, Wagner VC, Fratini M, Dobritsch D, Fuszard M, Heilmann M, Heilmann I (2022):** The pollen-specific class VIII-myosin ATM2 from *Arabidopsis thaliana* associates with the plasma membrane through a polybasic region binding anionic phospholipids. *Biochimie*.

**Knight AE, Kendrick-Jones J (1993):** A myosin-like protein from a higher plant. *Journal of molecular biology* 231: 148–154.

**Kong B, Guo GL (2011):** Enhanced in vitro refolding of fibroblast growth factor 15 with the assistance of SUMO fusion partner. *PloS one* 6: e20307.

**König S, Ischebeck T, Lerche J, Stenzel I, Heilmann I (2008):** Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *The Biochemical journal* 415: 387–399.

**Kost B (2008):** Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends in cell biology* 18: 119–127.

**Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, Hong Y, Toliaas K, Carpenter C, Chua NH (1999):** Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *The Journal of cell biology* 145: 317–330.

**Kurochkina N, Guha U (2013):** SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophysical reviews* 5: 29–39.

**Kutateladze T, Overduin M (2001):** Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science (New York, N.Y.)* 291: 1793–1796.

**Laemmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

**Lange C, Rudolph R (2008):** Production of Recombinant Proteins by In Vitro Folding. In: Fersht AR (Hrsg.), *Protein Science Encyclopedia*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

**Launhardt L (2017):** Lipidbindungseigenschaften rekombinanter ROP-GTPasen aus *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit 2017.

**Li J, Liu H, Raval MH, Wan J, Yengo CM, Liu W, Zhang M (2019):** Structure of the MORN4/Myo3a Tail Complex Reveals MORN Repeats as Protein Binding Modules. *Structure (London, England : 1993)* 27: 1366-1374.e3.

**Liang L, Wang H, Shi H, Li Z, Yao H, Bu Z, Song N, Li C, Xiang D, Zhang Y, Wang J, Hu Y, Xu Q, Ma Y, Cheng Z, Wang Y, Zhao S, Qian J, Chen Y, Fang J-Y, Xu J (2018):** A Designed Peptide Targets Two Types of Modifications of p53 with Anti-cancer Activity. *Cell chemical biology* 25: 761-774.e5.

**Lin F, Krishnamoorthy P, Schubert V, Hause G, Heilmann M, Heilmann I (2019):** A dual role for cell plate-associated PI4K $\beta$  in endocytosis and phragmoplast dynamics during plant somatic cytokinesis. *The EMBO journal* 38.

**Liu A, Sui D, Wu D, Hu J (2016):** The activation loop of PIP5K functions as a membrane sensor essential for lipid substrate processing. *Science advances* 2: e1600925.

**Llinas P, Pylypenko O, Isabet T, Mukherjea M, Sweeney HL, Houdusse AM (2012):** How myosin motors power cellular functions: an exciting journey from structure to function: based on a lecture delivered at the 34th FEBS Congress in Prague, Czech Republic, July 2009. *The FEBS journal* 279: 551–562.

**Ma X, Shor O, Diminshtein S, Yu L, Im YJ, Perera I, Lomax A, Boss WF, Moran N (2009):** Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate inhibits K<sup>+</sup>-efflux channel activity in NT1 tobacco cultured cells. *Plant physiology* 149: 1127–1140.

**Mecklenburg KL, Takemori N, Komori N, Chu B, Hardie RC, Matsumoto H, O'Tousa JE (2010):** Retinophilin is a light-regulated phosphoprotein required to suppress photoreceptor dark noise in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 1238–1249.

- Mei Y, Jia W-J, Chu Y-J, Xue H-W (2012):** Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitropism through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. *Cell research* 22: 581–597.
- Menzel W, Stenzel I, Helbig L-M, Krishnamoorthy P, Neumann S, Eschen-Lippold L, Heilmann M, Lee J, Heilmann I (2019):** A PAMP-triggered MAPK cascade inhibits phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate production by PIP5K6 in Arabidopsis thaliana. *The New phytologist* 224: 833–847.
- Mermall V, Post PL, Mooseker MS (1998):** Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science (New York, N.Y.)* 279: 527–533.
- Morriswood B (2015):** Form, Fabric, and Function of a Flagellum-Associated Cytoskeletal Structure. *Cells* 4: 726–747.
- Mueller-Roeber B, Pical C (2002):** Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant physiology* 130: 22–46.
- Mühlhausen S, Kollmar M (2013):** Whole genome duplication events in plant evolution reconstructed and predicted using myosin motor proteins. *BMC evolutionary biology* 13: 202.
- Munnik T, Nielsen E (2011):** Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Current opinion in plant biology* 14: 489–497.
- Murphy CI, Piwnica-Worms H, Grünwald S, Romanow WG, Francis N, Fan H-Y (2004):** Expression and purification of recombinant proteins using the baculovirus system. *Current protocols in molecular biology* Chapter 16: Unit 16.11.
- Naughton FB, Kalli AC, Sansom MSP (2018):** Modes of Interaction of Pleckstrin Homology Domains with Membranes: Toward a Computational Biochemistry of Membrane Recognition. *Journal of molecular biology* 430: 372–388.
- Noack LC, Jaillais Y (2020):** Functions of Anionic Lipids in Plants. *Annual review of plant biology* 71: 71–102.
- Odronitz F, Kollmar M (2007):** Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome biology* 8: R196.
- Ohlrogge J, Browse J (1995):** Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 957–970.

**Orr RG, Furt F, Warner EL, Agar EM, Garbarino JM, Cabral SE, Dubuke ML, Butt AM, Munson M, Vidali L (2021):** Rab-E and its interaction with myosin XI are essential for polarised cell growth. *The New phytologist* 229: 1924–1936.

**Peremyslov VV, Klocko AL, Fowler JE, Dolja VV (2012):** Arabidopsis Myosin XI-K Localizes to the Motile Endomembrane Vesicles Associated with F-actin. *Frontiers in plant science* 3: 184.

**Peremyslov VV, Prokhnevsky AI, Avisar D, Dolja VV (2008):** Two class XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in Arabidopsis. *Plant physiology* 146: 1109–1116.

**Peremyslov VV, Prokhnevsky AI, Dolja VV (2010):** Class XI Myosins Are Required for Development, Cell Expansion, and F-Actin Organization in Arabidopsis. *The Plant Cell* 22: 1883–1897.

**Perera IY, Davis AJ, Galanopoulou D, Im YJ, Boss WF (2005):** Characterization and comparative analysis of Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate 5-kinase 10 reveals differences in Arabidopsis and human phosphatidylinositol phosphate kinases. *FEBS letters* 579: 3427–3432.

**Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingová H, Kyselá K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, Lanerolle P de, Hozák P, Grummt I (2004):** Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nature cell biology* 6: 1165–1172.

**Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Del Marquès-Bueno MM, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche J-B, Nollmann M, Miège C, Moreau P, Martinière A, Jaillais Y (2019):** Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science (New York, N.Y.)* 364: 57–62.

**Prokhnevsky AI, Peremyslov VV, Dolja VV (2008):** Overlapping functions of the four class XI myosins in Arabidopsis growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 19744–19749.

**Rao VD, Misra S, Boronenkov IV, Anderson RA, Hurley JH (1998):** Structure of Type II $\beta$  Phosphatidylinositol Phosphate Kinase. *Cell* 94: 829–839.

**Rausche J, Stenzel I, Stauder R, Fratini M, Trujillo M, Heilmann I, Rosahl S (2021):** A phosphoinositide 5-phosphatase from *Solanum tuberosum* is activated by PAMP-treatment

and may antagonize phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate at *Phytophthora infestans* infection sites. *The New phytologist* 229: 469–487.

**Reddy AS, Day IS (2001):** Kinesins in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC genomics* 2: 2.

**Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluska F, Samaj J, Volkmann D, Kendrick-Jones J (1999):** Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19: 555–567.

**Rhoads AR, Friedberg F (1997):** Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11: 331–340.

**Rosano GL, Ceccarelli EA (2014):** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5: 172.

**Ryan JM, Nebenführ A (2018):** Update on Myosin Motors: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Plant physiology* 176: 119–127.

**Santiago E, Akamine P, Snider J, Wong V, Jessulat M, Deineko V, Gagarinova A, Aoki H, Minic Z, Phanse S, San Antonio A, Cubano LA, Rymond BC, Babu M, Stagljar I, Rodriguez-Medina JR (2016):** Novel Interactome of *Saccharomyces cerevisiae* Myosin Type II Identified by a Modified Integrated Membrane Yeast Two-Hybrid (iMYTH) Screen. *G3 (Bethesda, Md.)* 6: 1469–1474.

**Sattarzadeh A, Franzen R, Schmelzer E (2008):** The *Arabidopsis* class VIII myosin ATM2 is involved in endocytosis. *Cell motility and the cytoskeleton* 65: 457–468.

**Schneider CP, Shukla D, Trout BL (2011):** Arginine and the Hofmeister Series: the role of ion-ion interactions in protein aggregation suppression. *The journal of physical chemistry. B* 115: 7447–7458.

**Shikiya Y, Tomita S, Arakawa T, Shiraki K (2013):** Arginine inhibits adsorption of proteins on polystyrene surface. *PloS one* 8: e70762.

**Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011):** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539.

- Simm D, Hatje K, Kollmar M (2015):** Waggawagga: comparative visualization of coiled-coil predictions and detection of stable single  $\alpha$ -helices (SAH domains). *Bioinformatics* (Oxford, England) 31: 767–769.
- Sousa E, Kost B, Malhó R (2008):** Arabidopsis phosphatidylinositol-4-monophosphate 5-kinase 4 regulates pollen tube growth and polarity by modulating membrane recycling. *The Plant Cell* 20: 3050–3064.
- Steinmetz MO, Jelesarov I, Matousek WM, Honnappa S, Jahnke W, Missimer JH, Frank S, Alexandrescu AT, Kammerer RA (2007):** Molecular basis of coiled-coil formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7062–7067.
- Stenmark H, Aasland R, Driscoll PC (2002):** The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS letters* 513: 77–84.
- Stenzel I, Ischebeck T, König S, Holubowska A, Sporysz M, Hause B, Heilmann I (2008):** The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 20: 124–141.
- Stenzel I, Ischebeck T, Quint M, Heilmann I (2012):** Variable Regions of PI4P 5-Kinases Direct PtdIns(4,5)P(2) Toward Alternative Regulatory Functions in Tobacco Pollen Tubes. *Frontiers in plant science* 2: 114.
- Studier F, Moffatt BA (1986):** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189: 113–130.
- Sweeney HL, Holzbaur ELF (2018):** Motor Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10.
- TAKESHIMA H (2000):** Junctophilins A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins. *Molecular Cell* 6: 11–22.
- Talts K, Ilau B, Ojangu E-L, Tanner K, Peremyslov VV, Dolja VV, Truve E, Paves H (2016):** Arabidopsis Myosins XI1, XI2, and XIK Are Crucial for Gravity-Induced Bending of Inflorescence Stems. *Frontiers in plant science* 7: 1932.
- Tejos R, Sauer M, Vanneste S, Palacios-Gomez M, Li H, Heilmann M, van Wijk R, Vermeer JEM, Heilmann I, Munnik T, Friml J (2014):** Bipolar Plasma Membrane Distribution of Phosphoinositides and Their Requirement for Auxin-Mediated Cell Polarity and Patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26: 2114–2128.

**Thole JM, Nielsen E (2008):** Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current opinion in plant biology* 11: 620–631.

**Thole JM, Vermeer JEM, Zhang Y, Gadella TWJ, Nielsen E (2008):** Root hair defective4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 20: 381–395.

**Tominaga M, Kimura A, Yokota E, Haraguchi T, Shimmen T, Yamamoto K, Nakano A, Ito K (2013):** Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. *Developmental cell* 27: 345–352.

**Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Orii H, Nakamori R, Katayama E, Anson M, Shimmen T, Oiwa K (2003):** Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *The EMBO journal* 22: 1263–1272.

**Ueda H, Yokota E, Kutsuna N, Shimada T, Tamura K, Shimmen T, Hasezawa S, Dolja VV, Hara-Nishimura I (2010):** Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 6894–6899.

**Vasileva E, Shuvalov O, Petukhov A, Fedorova O, Daks A, Nader R, Barlev N (2020):** KMT Set7/9 is a new regulator of Sam68 STAR-protein. *Biochemical and biophysical research communications* 525: 1018–1024.

**Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S (2006):** Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Molecular Cell* 23: 749–755.

**Wang F, Chen L, Arcucci O, Harvey EV, Bowers B, Xu Y, Hammer JA, Sellers JR (2000):** Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *The Journal of biological chemistry* 275: 4329–4335.

**Welters P, Takegawa K, Emr SD, Chrispeels MJ (1994):** AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11398–11402.

**Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (1999):** Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 112: 531–552.

**Williams ME, Torabinejad J, Cohick E, Parker K, Drake EJ, Thompson JE, Hortter M, Dewald DB (2005):** Mutations in the Arabidopsis phosphoinositide phosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant physiology* 138: 686–700.

**Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007):** An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* 2: e718.

**Wu S-Z, Ritchie JA, Pan A-H, Quatrano RS, Bezanilla M (2011):** Myosin VIII regulates protonemal patterning and developmental timing in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular plant* 4: 909–921.

**Ye J, Zhao J, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I (2008):** Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes & development* 22: 322–330.

**Yilmaz H, Faburay B, Turan N, Cotton-Caballero M, Cetinkaya B, Gurel A, Yilmaz A, Cizmecigil UY, Aydin O, Tarakci EA, Bayraktar E, Richt JA (2019):** Production of Recombinant N Protein of Infectious Bronchitis Virus Using the Baculovirus Expression System and Its Assessment as a Diagnostic Antigen. *Applied biochemistry and biotechnology* 187: 506–517.

**Zhao Y, an Yan, Feijó JA, Furutani M, Takenawa T, Hwang I, Fu Y, Yang Z (2010):** Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in Arabidopsis and tobacco. *The Plant Cell* 22: 4031–4044.

**Zheng J, Trafny EA, Knighton DR, Xuong NH, Taylor SS, Eyck LF ten, Sowadski JM (1993):** 2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 49: 362–365.

**Zhu J (2012):** Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances* 30: 1158–1170.

## 8 Anhang

**Tabelle 14: Verwendete Primer für Klonierung.** Der Vektor bezeichnet das Plasmid, in dem das Zielgen kloniert wurde. Das Plasmid, bzw. das Gen ist die Matrizen-DNA für die PCR. Die Bezeichnung der Oligonukleotide für die PCR beinhaltet das entsprechende Restriktionsenzym und die Position, an der sie in der DNA binden und in welche Richtung die Polymerase arbeitet (**for** – forward, **rev** – reverse).

Vektor	Plasmid/Gen	Protein	Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
pPR3-N	At3g19960	ATM1 (komplett)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCATGTCTCAGAAGGTTAC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTCAATACCTGGTGCTATTTC
		ATM1 (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCGGTGCCAAGACAAATGAGTTAG
	At5g54280	ATM2 (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCCGCAATGTGGCGACAAAATCAAAG
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTAGCCTCTTTTCCCCACC
	At1g50360	VIII-A (Motor + IQ)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCATGGCACACAAGGTT
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTCAGCCACCAGAATAAGC
		VIII-A (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACCAAGAGAAATGAGTCAGAC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTTAATACCTAGTACTCCTCAAC
	At4g27370	VIII-B (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCCGCAATGAGAAGAAAAAAC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTCAATAACTTTTCTGCACC
	At1g17580	XI-1 (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACCGGTGCTCTTAAAGATGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTCAATCTGACCTTCCAACAAG
	At5g43900	XI-2 (Motor + IQ)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCATGGTTGCTAACTTC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTATTCTCTAGCAGCCATC
		XI-2 (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACTGGAGCACTCCAAGCAGCC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTTAGTGCAAGAATACAAATG
	At1g04600	XI-A (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACAGGAGCACTTCAAGATGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTATTCTTGAGAAAAGAGGAAG
	At1g04160	XI-B (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACAGGAGCTCTTCAAGAAGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTAGTGCAAGAATACGAATTC
	At1g08730	XI-C (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACAGGAGCACTTAAAGAGGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTACTCAGAGACTGGCAATAAG
	At2g33240	XI-D (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACAGGTGCCCTCCAAGACGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTATTCTTCAGAAAAGTGGAAG
	At1g54560	XI-E (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACAGGCGCACTGAAAGAGGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTTAGTCAGAACATGGCAATAG
	At2g2029	XI-G (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACTGTAGTCCTTCAAGCTGC
			Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTAATGTAAGAATATGAAAG
	At4g28710	XI-H (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACGGGAGTCCTTGAAGCTGCC
Sfi1_rev			ATGCGGCCGAGGCGGCCCTTATCAAGAACTGAAAGC	
At4g33200	XI-I (Motor + IQ)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCATGAGAAATTGTCTTC	
		Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTACTGCAACC GCCATTCA	
	XI-I (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCCTTGAAGAAACGATTGAGAAC	
		Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTCAAATGATCTGCTTTGAGG	
At5g20490	XI-K (C-Terminus)	Sfi1_for	ATGCGGCCATTACGGCCACAGGAGCCCTTAGAGAGGC	
		Sfi1_rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTTACGATGTACTGCCTTCTTAC	
Champion	pMAL c5G mit	His <sub>6</sub>	NotI_for	ATGCGCGGCCGATGATGCGTGAACCG

pETSUMO adapt	PIP5K2	SUMO-PIP5K2	XhoI_rev	ATGCCTCGAGTTAGCCGTCTTCGATG
pGEX- 6P-1	pET28a mit ATM1	GST-ATM1 <sub>1110-1166</sub>	BamHI_for	ATGCGGATCCGATCGCGAACTGCGTCGTCT
			Sal_rev	ATGCGTCGACTTAATAACGGGTGCTATTGC
	pET28a mit ATM2	GST-ATM2 <sub>1174-1220</sub>	BamHI_for	ATGCGGATCCGAAGATGAATTCCGTCGCCT
			Sall_rev	ATGCGTCGACTTAGCCACGTTTGCCCCAC
	pET28a mit VIII-A	GST-VIII-A <sub>1097-1153</sub>	BamHI_for	ATGCGGATCCGATCGTGAAGTGCGCCGTCT
			Sall_rev	ATGCGTCGACTTAATAACGGGTGCTGCGCA
	pET28a mit VIII-B	GST-VIII-B <sub>1089-1134</sub>	BamHI_for	ATGCGGATCCGAAGAAGTGCCTGCTGAA
			Sall_rev	ATGCGTCGACTTAATAGCTTTTTTTACACC

**Tabelle 15: Verwendete Primer für Sequenzierung**

Analytierte Sequenz	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
ATM1	ATM1_seq1_for	TAGGTACAACCAAGACATG
	ATM1_seq2_for	GATGCTGAACGTTTT
	ATM1_seq3_for	GAGGTTACATATGAGACG
	ATM1_seq4_for	CAGTTTAATATCTTG
VIII-A	VIII-A_seq1_for	TTGAAGCATACAGGAAGAG
	VIII-A_seq2_for	GTTGAACCTGAACCAGATG
	VIII-A_seq3_for	CGGGGAAGGCTTTC
	VIII-A_seq4_for	CATGGCATTTTACGT
XI-1	XI-1_seq_for	GAAGCTGGAAGAAAA
XI-2	XI-2_seq1_for	GTTGGAGTCGAATCCTG
	XI-2_seq2_for	TTGATCCAGAAGCTGCTAC
	XI-2_seq3_for	TTATTGCCGAGCATCAG
	XI-2_seq4_for	CAGCAAGCATTATTCAGAG
	XI-2_seq5_for	TGACCTGGAGATTGC
XI-A	XI-A_seq_for	CTCTCTAAGGGACTT
XI-B	XI-B_seq_for	TCTGTAGCAGGGCATCC
XI-C	XI-C_seq_for	GATGATGCAGTGAGGA
XI-D	XI-D_seq_for	GCACTTGTGAGTTCAT
XI-E	XI-E_seq_for	TGATGCAAGGCCAAG
XI-G	XI-G_seq_for	GCATCAGGACGATTCC
XI-H	XI-H_seq_for	CCGACTCCAGTTAAG
XI-I	XI-I_seq1_for	GTAGAATATCTGGTGCCG
	XI-I_seq2_for	GCAAGATCCAGAATCTCG
	XI-I_seq3_for	CAGAGCCTCACTATGTTCT
	XI-I_seq4_for	CGAGCTGCTTCTCTAATTC
	XI-I_seq5_for	GAGAACTCTCTCAT
XI-K	XI-K_seq_for	TCGCCAACCAGCAGAA
PIP5K2	PIP5K2_seq1_for	ATTTTGACCCAAGTGA AAA
	PIP5K2_seq1_rev	TTTTCACTTGGGTCAAAT
	PIP5K2_seq2_for	AAGAGATATGCCAACGGAGA
	PIP5K2_seq3_for	TTACTATGAAGGTACATGGC
	PIP5K2_seq4_for	TATCTCATTGTATTGAGA

	PIP5K2_seq4_rev	TCTCAATACAAATGGAGATA
	PIP5K2_seq5_for	TAGTAATCTCATGAGGAATT
	PIP5K2_seq5_rev	AATTCCTCATGAGATTACTA
pGEX-6P-1	pGEX_for	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
	pGEX_rev	CCGGGAGCTGCATGTGTCTAGAGG
pMAL	pMAL_for	ATGCCGAACATCCCGCAGAT
	pMAL_rev	TTGTCCTACTCAGGAGAGCGTT
pPR3N	pPR3N_for	ATGCAGATTTTCGTCAAGACTTT
	pPR3N_rev	ATAACTAATTACATGACT
T7 (in pET-Vektoren)	Promotor_for	TAATACGACTCACTATAGGG
	Terminator_rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

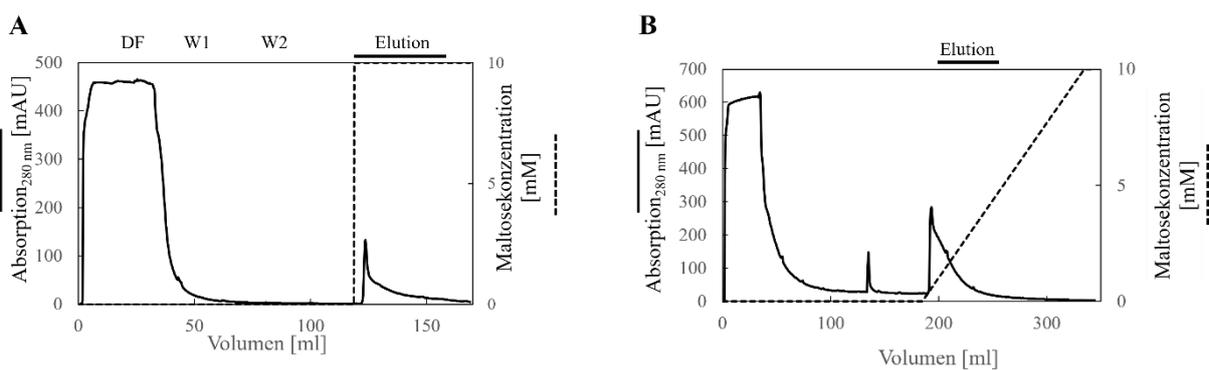
**Tabelle 16: Verwendete Konstrukte für Genexpression in *E. coli***

Plasmid	Konstrukt	Aminosäuren	Besonderheit	Ursprung
pMAL c5G	MBP-PIP5K2	1 – 754	-	Dr. Jennifer Lerche
	MBP-PIP5K6	1 – 715		Dr. Franziska Hempel
Champion pETSumo adapt	His <sub>6</sub> -SUMO-PIP5K2	1 – 754	-	Während des PhD kloniert
	His <sub>6</sub> -SUMO-PIP5K6	1 – 715		Johanna Nordmeier
pET28a	His <sub>6</sub> -ATM1 <sub>941-1166</sub>	941 – 1166	Codon- optimiert für <i>E.</i> <i>coli</i>	BioCat, Heidelberg, Deutschland
	His <sub>6</sub> -ATM2 <sub>972-1220</sub>	972 – 1220		
	His <sub>6</sub> -VIII-A <sub>934-1153</sub>	934 – 1153		
	His <sub>6</sub> -VIII-B <sub>921-1134</sub>	921 – 1134		
pGEX-6P-1	GST-ATM1 <sub>1110-1166</sub>	1110 – 1166	Codon- optimiert für <i>E.</i> <i>coli</i>	Während des PhD kloniert
	GST-ATM2 <sub>1174-1220</sub>	1174 – 1220		
	GST-VIII-A <sub>1097-1153</sub>	1097 – 1153		
	GST-VIII-B <sub>1089-1134</sub>	1089 – 1134		

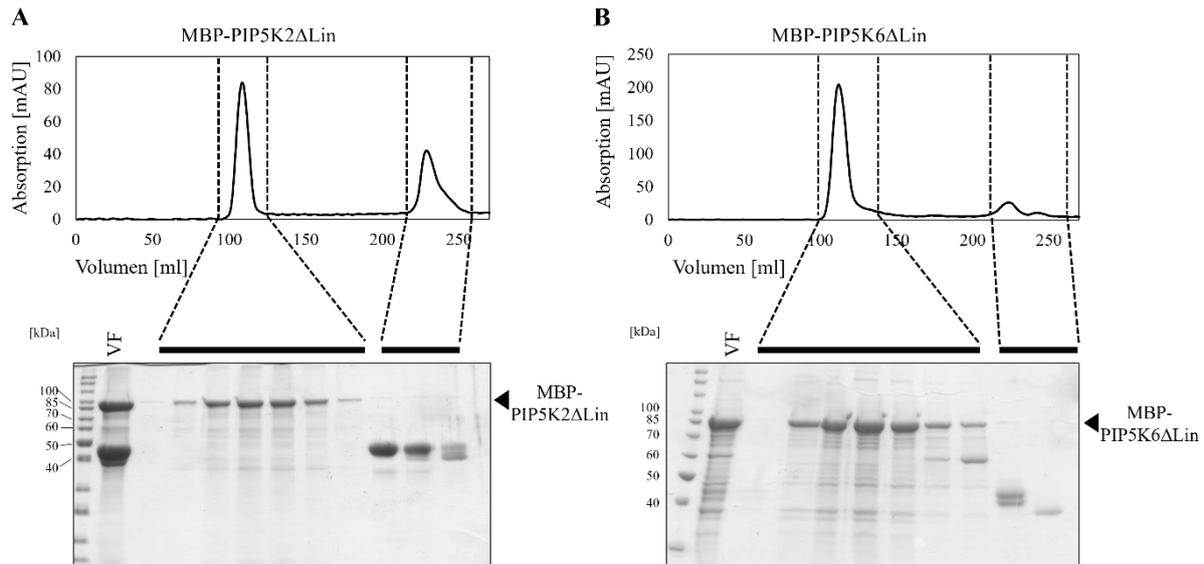
**Tabelle 17: Verwendete Konstrukte für Hefe-Zwei-Hybrid-Studien.** Zur Analyse der möglichen Interaktionsregion wurden trunkierte Varianten diverser Proteine erzeugt. **Kat** – Katalytische Domäne, **Dim** – Dimerisierungsdomäne, **Lin** – Linkerdomäne, **MORN** – membrane occupation and recognition nexus, **Nt** – N-Terminus, **Ct** – C-Terminus, **IQ** – IQ-Domäne, rotmarkierte Proteine gehören zu Myosinen der Klasse VIII, blaumarkierte Proteine gehören zur Klasse XI, **MH** – Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg, **BS** – Benita Schmitz, PhD-Student AG Heilmann, MLU Halle-Wittenberg, **FD** – Dr. Franziska Daamen, MLU Halle-Wittenberg, **FH** – Dr. Franziska Hempel, MLU Halle-Wittenberg.

Plasmid	Konstrukt	Aminosäuren	Ursprung
pBT3C-Ost4	PIP5K1	1 – 754 (komplett)	MH
	PIP5K2	1 – 754 (komplett)	MH
	PIP5K2	410 – 754 (Kat)	MH
	PIP5K2	344 – 754 (Kat + Dim)	MH
	PIP5K2	260 – 754 (Kat + Dim + Lin)	MH
	PIP5K2	1 – 409 (Nt + MORN + Lin + Dim)	MH

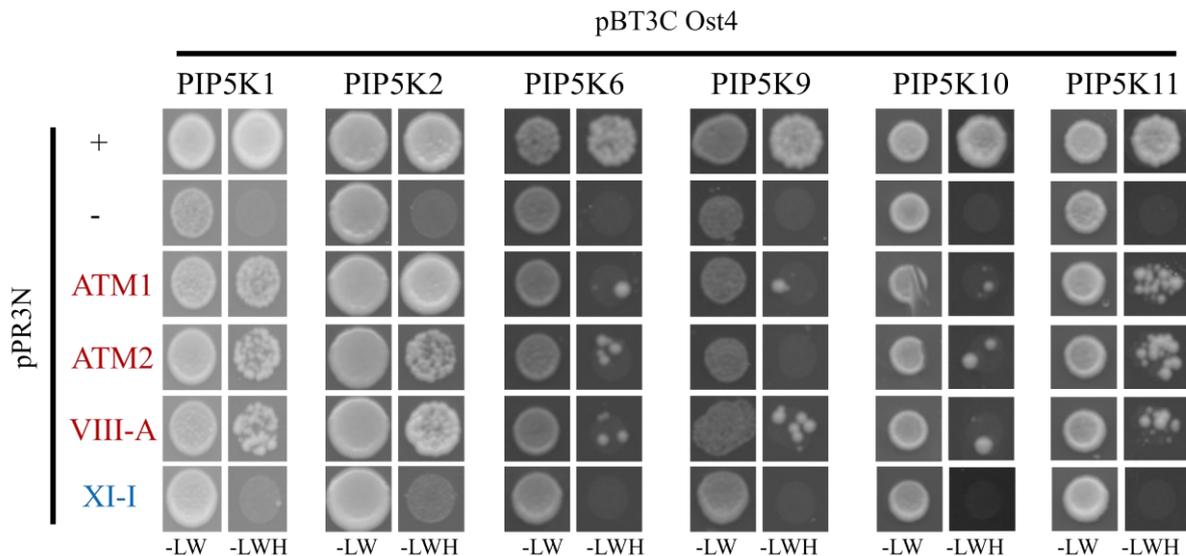
	PIP5K2	1 – 343 (Nt + MORN + Lin)	BS
	PIP5K6	1 – 715 (komplett)	FH
	PIP5K9	1 – 815 (komplett)	FD
	PIP5K10	1 – 401 (komplett)	MH
	PIP5K11	1 – 427 (komplett)	MH
pPR3-N	ATM1	941 – 1166 (Ct)	Während des PhD kloniert
	ATM1	1 – 1166 (komplett)	
	ATM2	972 – 1220 (Ct)	
	VIII-A	933 – 1153 (Ct)	
	VIII-A	1 – 932 (Motor + IQ)	
	VIII-B	921 – 1134 (Ct)	
	XI-1	881 – 1520 (Ct)	
	XI-2	883 – 1505 (Ct)	
	XI-2	1 – 882 (Motor + IQ)	
	XI-A	883 – 1730 (Ct)	
	XI-B	884 – 1500 (Ct)	
	XI-C	892 – 1538 (Ct)	
	XI-D	900 – 1770 (Ct)	
	XI-E	887 – 1529 (Ct)	
	XI-G	889- 1493 (Ct)	
	XI-H	890 – 1516 (Ct)	
	XI-I	889 – 1522 (Ct)	
	XI-I	1 – 888 (Motor + IQ)	
	XI-K	884 – 1531 (Ct)	



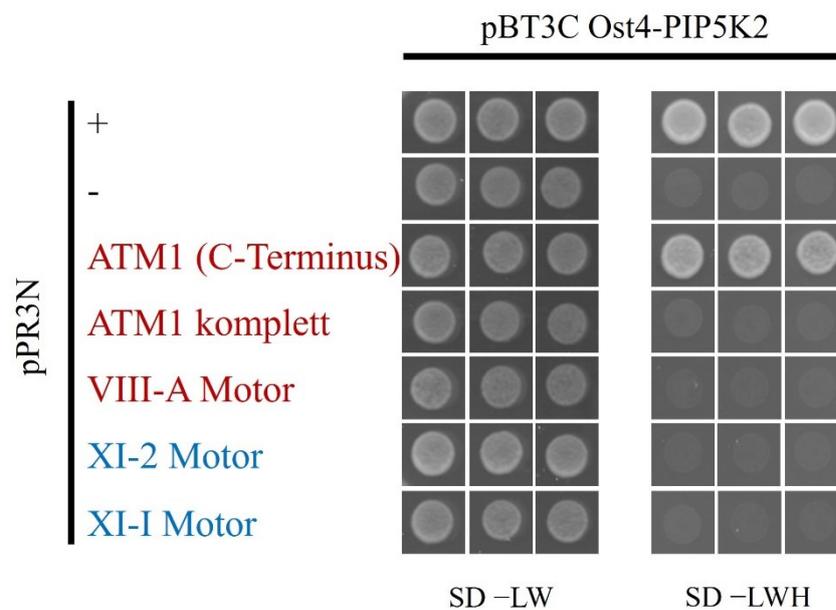
**Abbildung 28: Chromatogramme der Anreicherungen von MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K6.** Chromatogramme der Anreicherungen von MBP-PIP5K2 (**A**) und MBP-PIP5K6 (**B**). Die löslichen Überstände aus den Zellaufschlüssen wurden jeweils über eine 5 ml MBPTrap HP gegeben. Die Chromatographie wurde bei 4 °C mithilfe einer ÄKTA™ FPLC durchgeführt. Die Elution erfolgte bei MBP-PIP5K2 mit 10 mM Maltose. DF – Durchfluss, W1 – Waschfraktion 1, W2 – Waschfraktion 2. Die Elution von MBP-PIP5K6 erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 mM auf 10 mM Maltose in 30 Säulenvolumina.



**Abbildung 29: Größenausschlusschromatographien der verkürzten Varianten von MBP-PIP5K2 $\Delta$ Lin und MBP-PIP5K6 $\Delta$ Lin ohne Linker- und MORN-Domäne.** Die verkürzten PI4P 5-Kinasen PIP5K2 (A) und PIP5K6 (B) ohne Linker- und MORN-Domäne wurden mit einer N-terminalen MBP-Fusion in *E. coli* heterolog exprimiert, über eine Amylose-Matrix angereichert, die Elutionsfraktionen vereinigt (VF) und anschließend über eine HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade gegeben. Oben sind die Chromatogramme dargestellt und unten sind die Proteinzusammensetzungen verschiedener Fraktionen über eine SDS-PAGE (12 % Acrylamid) analysiert worden. MBP-PIP5K2 $\Delta$ Lin hat eine berechnete molekulare Masse von 90,3 kDa und MBP-PIP5K6 $\Delta$ Lin hat eine berechnete molekulare Masse von 88,2 kDa. N = 1



**Abbildung 30: Hefe-Zwei-Hybrid-Studien von diversen PI4P 5-Kinasen mit ausgewählten Myosinen aus *A. thaliana*.** Es wurde die Interaktion von PIP5K1 (N = 1, n = 5), PIP5K2 (N = 3, n = 15), PIP5K6 (N = 2, n = 10), PIP5K9 (N = 1, n = 5), PIP5K10 (N = 1, n = 5) und PIP5K11 (N = 2, n = 10) im pBT3C-Ost4-Vektor als Köderprotein mit den C-Termini von ausgewählten Myosinen im pPR3N-Vektor als Beuteprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. Es war pAI-Alg5 die Positivkontrolle und pDL-Alg5 die Negativkontrolle. Myosine der Klasse VIII sind rot und Myosin XI-I (Klasse XI) ist blau geschrieben. Es wurden jeweils 4  $\mu$ l der Hefezellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf zwei Selektionsmedien kultiviert. Die Hefekolonien wurden auf SD-LW ausplattiert, um kotransformierte Hefezellen zu selektieren und ein einheitliches Wachstum der Zellproben zu kontrollieren. Die Selektion auf SD-LWH zeigt die Interaktion der zu testenden Proteine an. Die Platten wurden für 5 - 7 Tage bei 30 °C inkubiert.

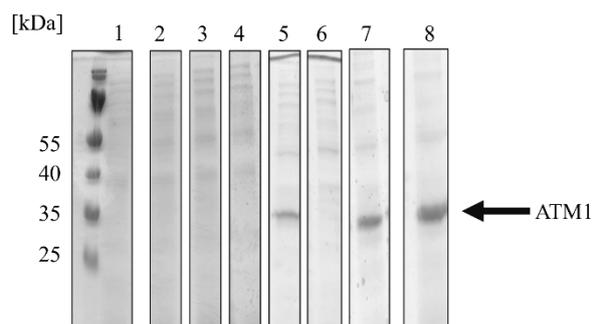


**Abbildung 31: Hefe-Zwei-Hybrid-Test von PIP5K2 mit Myosinvarianten aus *A. thaliana*.** Es wurde die Interaktion von PIP5K2 (N = 1, n = 5) im pBT3C-Ost4-Vektor als Köderprotein mit dem kompletten ATM1 und Motordomänen von ATM1, VIII-A (Myosine der Klasse VIII, rot), XI-2 und XI-I (Myosine der Klasse XI, blau) im pPR3N-Vektor als Beuteprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. pAI-Alg5 und pPR3N-ATM1 (C-Terminus) dienen als Positivkontrollen und pDL-Alg5 als Negativkontrolle. Es wurden jeweils 4 µl der Hefezellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf zwei Selektionsmedien kultiviert. Die Hefekolonien wurden auf SD-LW ausplattiert, um kotransformierte Hefezellen zu selektieren und ein einheitliches Wachstum der Zellproben zu kontrollieren. Die Selektion auf SD-LWH zeigt die Interaktion der zu testenden Proteine an. Die Platten wurden für 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

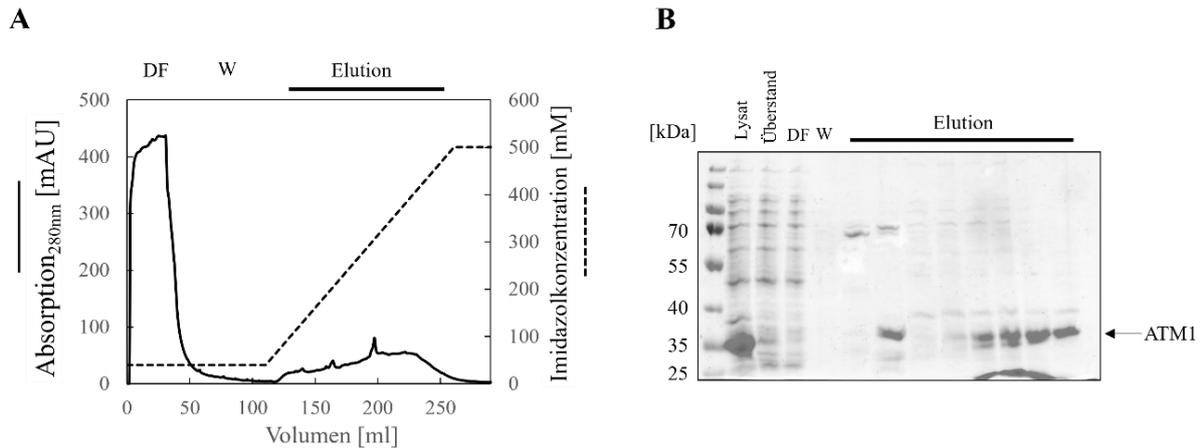
Puffer	Tris pH*	NaCl [mM]	Tween	L-Arg [mM]
1	6**	200	-	-
2	7,5	200	-	-
3	8,0	200	-	-
4	7,5	100	-	-
5	7,5	500	-	-
6	7,5	200	0,1 %	-
7	7,5	750	-	-
8	7,5	-	-	1000

\*20 mM/ bei 4°C eingestellt

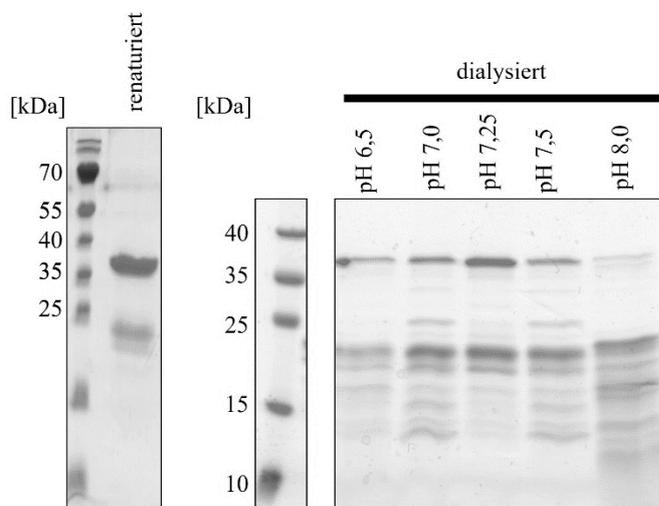
\*\* 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>



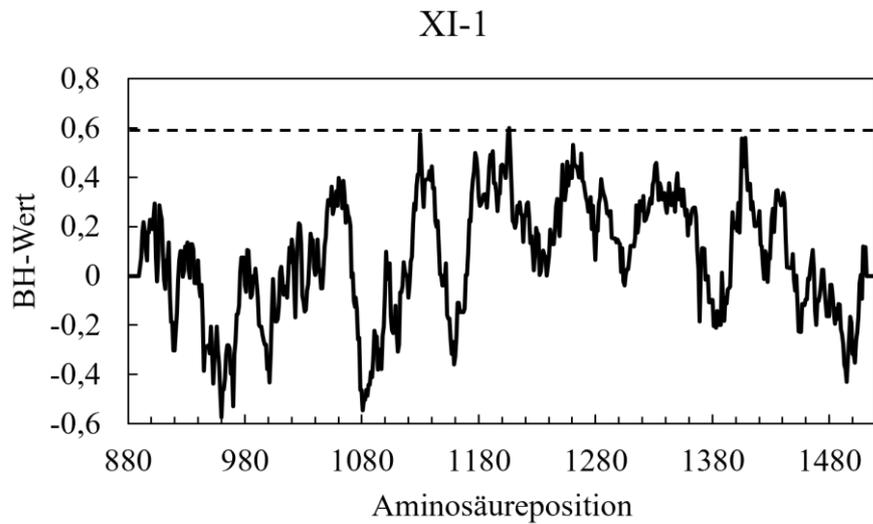
**Abbildung 32: SDS-Gele (15 % Acrylamid) von Löslichkeits-Analysen des ATM1-Proteins.** Nach vierstündiger Expression bei 37 °C von ATM1 (28 kDa) in *E. coli* Rosetta2 (DE3) wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension bei 8000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden mit je 1 ml diverser Puffer (Zusammensetzung links) mittels Ultraschalls aufgeschlossen, für 30 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert und 15 µl des Überstandes aufgetrennt.



**Abbildung 33: Native Anreicherung von ATM1 mithilfe einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix.** Es wurden 35 ml des ATM1-Lysates bei 108.860 x g und 4 °C für 60 min zentrifugiert und der Überstand auf eine 5 ml HisTrap™ HP geladen. Die Chromatographie erfolgte mithilfe der ÄKTA™ FPLC. **A)** Chromatogramm der Anreicherung von Myosin ATM1. Es wurde die Absorption bei 280 nm kontinuierlich gemessen. Das Beladen auf die Chromatographiesäule erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Nachdem das Protein an der Matrix gebunden war, wurde die Säule mit 90 ml Bindepuffer bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten mit einer Flussrate von 2 ml/min, wobei die Konzentration von 0 mM auf 500 mM Imidazol in 130 ml mit Elutionspuffer erhöht wurde. Das eluierte Protein wurde in 2 ml-Fractionen aufgefangen. DF – Durchfluss, W - Waschfraktion und verschiedene Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert. **B)** SDS-Gel (10 % Acrylamid) der SDS-PAGE mit den analysierten Fraktionen aus der Chromatographie **A)**. Es wurden 2 µl des Lysates, des Überstandes bzw. des Durchflusses analysiert und jeweils 15 µl verschiedener Elutionsfraktionen. Das Gel wurde mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. N = 1



**Abbildung 34: SDS-Gele von renaturiertem und dialysiertem His<sub>6</sub>-ATM<sub>2</sub><sup>972-1220</sup>.** Rechts: Es wurden 15 µl aus dem Überstand nach Zentrifugation des Renaturierungsansatzes von ATM2 im SDS-Gel (15 % Acrylamid) auf ihre Proteinzusammensetzung analysiert. Links: Das renaturierte ATM2 wurde gegen Puffer mit verschiedenen pH-Werten dialysiert und anschließend 7 Tage bei 20 °C ultrazentrifugiert. Danach wurden jeweils 15 µl der Proteinlösungen im vorgefertigten 4 – 20 %igen SDS-Gradientengel (SERVAGel™ TG PRIME™, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Gele wurden mit Quick Coomassie® Stain Lösung gefärbt. Das Zielprotein His<sub>6</sub>-ATM<sub>2</sub><sup>972-1220</sup> hat ein Molekulargewicht von 31 kDa, wird im SDS-Gel aber zwischen 35 kDa und 40 kDa detektiert.



**Abbildung 35: BH-Plot-Analyse des C-Terminus von Myosin XI-1.** BH-Werte der einzelnen Aminosäuren des C-Terminus von Myosin XI-1, einem Vertreter der Klasse XI-Myosine. Die Analyse basiert auf Brzeska et al., 2010. Es wurde definiert, dass BH-Werte über 0,6 (gestrichelte Linie) auf eine mögliche Bindungsstelle für anionische Phospholipide deuten.

## Danksagung

Die Promotion gehört wohl zu der anstrengendsten, aber auch zur spannendsten Zeit, die ich bisher erlebt habe. An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich in dieser Phase begleitet und mir geholfen haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Heilmann bedanken. Du hast mir die Möglichkeit gegeben, dieses außergewöhnliche Thema zu bearbeiten. Ich danke dir, dass ich bei dieser Arbeit meiner Kreativität freien Lauf lassen konnte und du dich geduldig mit meiner Gedankenwelt auseinandergesetzt hast. Das war sicher nicht immer leicht. Vielen Dank für deine fachliche Unterstützung und auch deine lockere und lustige Art, die immer eine schöne Atmosphäre gebracht hat. Danke für die motivierenden Gespräche und Gedanken, die das Projekt zum Erfolg geführt haben.

Natürlich möchte ich mich auch bei Dr. Mareike Heilmann bedanken. Du hast durch deine umfangreiche Betreuung im Labor nicht nur mein methodisches Wissen, sondern auch meine fachlichen Kompetenzen gestärkt. Danke, dass du immer da gewesen bist, wenn es Probleme gab. Ich werde auch die Zeit außerhalb des Labors immer in guter Erinnerung behalten.

Ein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Hauke Lilie. Auch nach meiner Masterarbeit in deiner Arbeitsgruppe hattest du stets ein offenes Ohr für mich. Du hast nicht nur die Messungen mit der AUZ durchgeführt, sondern hast mir auch mit vielen Tipps und Ideen, besonders bei der Renaturierung von Proteinen, geholfen. Durch unsere zahlreichen Gespräche habe ich die fantastische Welt der Proteine kennen und lieben gelernt. Ich werde die Zeit niemals vergessen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Dr. Larissa Launhardt bedanken. Wir kennen uns seit dem ersten Semester und haben am Ende unsere Doktorarbeit in der gleichen Arbeitsgruppe angefertigt. Wir waren Laborpartner, haben fast alle Module zusammen gemeistert und haben zusammen gelernt. Aber auch neben der Uni haben wir viel gespielt, gesungen, gefeiert, geredet, diskutiert und am Ende sind wir sogar noch ein großartiges Tanzpaar geworden. Das alles hat uns zu einem absoluten Dream-Team gemacht. Danke für diese wundervolle Zeit!

Auch ein großes Dankeschön an Monique, meine Leidensgenossin. Du gehörst zu den Menschen, die mir den Alltag so viel schöner gemacht haben. Du warst bei Problemen im Labor, aber auch bei persönlichen Krisen immer für mich da.

Vielen Dank an meine Studenten Lisa Freitag und Vera Wagner. Durch eure unermüdliche Hingabe konnte diese Arbeit erst zu dem werden, was es jetzt ist. Danke, dass ein Teil eurer Ergebnisse in meiner Dissertation sein kann!

Danke Franziska Daamen, dass du dir immer Zeit genommen hast für Fragen im Labor, hilfreiche Diskussionen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an die aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Kiefhaber, Uwe Fahndrich, Peter Enke, Matthias George Amos Binder und Vipul Kumar für Ideen und Ratschläge.

Vielen Dank auch an unsere technischen Assistenten Marion Sonntag und Kristin Peter für die zuverlässige Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Arbeitsgruppe für die schöne familiäre Atmosphäre, die tollen Gespräche, die Hilfsbereitschaft und natürlich die große Menge Kuchen bedanken: Ingo, Mareike, Irene, Marta, Alex, Larissa, Monique, Franzi, Lennart, Benita, Nadine, Johanna N., Johanna U., Angela, Vera, Marie, Marion, Kristin, Julia und Martina. Ihr alle habt dafür gesorgt, dass ich glücklich ins Labor komme. Ich habe die Promotionszeit dadurch sehr genossen.

Abschließend möchte ich mich natürlich auch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ihr habt mich bei jeder Entscheidung unterstützt und ihr habt mir immer geholfen. Ein großes Dankeschön geht an Tina Weber, Sophie Dauer, Hanna Liebich, Lisa Marschner und Nadine Dlikan. Ich kann nicht in Worte fassen, wie dankbar ich für unsere Freundschaft bin! Ich weiß nicht, wo ich ohne euch wäre.

## Lebenslauf

### Christoph Kastner

Geburtsdatum: 30.10.1993  
Geburtsort: Sangerhausen  
Nationalität: Deutsch

### Bildung

Seit 09/2018 **Promotion**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abteilung Pflanzenbiochemie (Prof. Dr. Ingo Heilmann)

10/2015 – 05/2018 **Master of Science der Biochemie**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2012 – 09/2015 **Bachelor of Science der Biochemie**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/2004 – 07/2012 **Abitur**  
Geschwister-Scholl-Gymnasium, Sangerhausen

### Veröffentlichung

Christoph Kastner, Vera C. Wagner, Marta Fratini, Dirk Dobritsch, Matthew Fuszard, Mareike Heilmann, Ingo Heilmann (2022): The pollen-specific class VIII-myosin ATM2 from *Arabidopsis thaliana* associates with the plasma membrane through a polybasic region binding anionic phospholipids. *Biochimie*.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Halle (Saale), den

Christoph Kastner