

**Isolierung von MAP-Kinase-Proteinkomplexen aus
*Arabidopsis thaliana***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Rita Schlichting

geboren am: 10. August 1976 in Freiberg

Gutachter /in

1. Prof. Dr. D. Scheel
2. Prof. Dr. R. B. Klösgen
3. Prof. Dr. T. Romeis

Halle (Saale), den 13.11.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012855

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012855>]

Zusammenfassung

Im Vergleich zu Hefe und tierischen Modellsystemen steht die Untersuchung von Kaskaden der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) und den dazugehörigen Regulationsmechanismen in Pflanzen noch am Anfang. Da auch Protein-Protein-Interaktionen als molekulare Basis der Regulation von MAPK-Kaskaden dienen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, MAPK-Proteinkomplexe aus *Arabidopsis thaliana* mittels *tandem affinity purification* (TAP) zu isolieren.

Zuerst wurde die Möglichkeit für einen immunologischen Nachweis der MAPK3 und 6 aus *Arabidopsis thaliana* geschaffen. Zudem konnten mittels Ausschlusschromatographie Hinweise über die Anwesenheit von AtMPK3 und 6 in Proteinkomplexen erbracht werden. Die Optimierung der Aufreinigung von AtMPK3-TAP gestaltete sich schwierig. So war die Anreicherung von markierter AtMPK3 deutlich geringer als die Anreicherung des TAP-markierten Transkriptionsfaktors AtTGA2. Mit Hilfe verschiedener Experimente konnte nicht geklärt werden, ob der große Verlust an AtMPK3-Protein auf eine Adsorption an die verwendeten Materialien und/oder auf eine Proteolyse zurückzuführen war. Erste Versuche, durch eine einstufige Affinitätsreinigung die Effizienz der Anreicherung von AtMPK3 zu verbessern und damit die Chancen für eine Identifizierung von eventuell mit AtMPK3 assoziierten Proteinen zu erhöhen, schlugen fehl.

Obwohl die Eluate nach der zweistufigen Affinitätschromatographie noch komplexe Proteinmischungen darstellten, waren nach der Auftrennung im denaturierenden Gradientengel und der Silberfärbung der Proteine Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteinproben nachweisbar. In einem Fall ließen sich im Anschluss an die MALDI-TOF MS-Analyse und die Datenbanksuche mit MASCOT mehrere der identifizierten Peptide der Sequenz von AtMPK3 zuordnen. Somit gelang zwar der massenspektrometrische Nachweis eines niedrig abundanten Proteins wie AtMPK3 in einer aus Blattmaterial erhaltenen Probe, jedoch nicht die Isolierung und Identifizierung von putativ mit AtMPK3 interagierenden Proteinen. Es bleibt zu klären, ob mit anderen Techniken der Proteomik wie ein- oder mehrdimensionaler *liquid chromatography* (LC) gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie nach einer affinitätschromatographischen Reinigung von AtMPK3 putative Interaktoren nachweisbar sind.

Summary

The study of MAPK cascades and their regulation in plants is just at the beginning compared to what is known about the MAPK networks in yeast and animals. Since protein-protein interactions play an important role as molecular base for the regulation of MAPK cascades, the aim of this work was to isolate MAPK protein complexes from *Arabidopsis thaliana* by tandem affinity purification (TAP).

In the first place antibodies were prepared to be able to detect MAPK3 and 6 from *Arabidopsis thaliana* by Western Blotting. Moreover, by using size exclusion chromatography it was possible to obtain indications of the presence of AtMPK3 and 6 in protein complexes. The optimisation of the purification of AtMPK3-TAP turned out to be difficult. The enrichment of AtMPK3 protein was significantly lower than the enrichment of the TAP-labelled transcription factor AtTGA2. By means of different experiments it was not possible to clarify, if the loss of AtMPK3 protein was due to the adsorption to the materials used and/or due to proteolysis. So far, the reduction of the loss of AtMPK3 protein by using one step instead of two step affinity purification failed.

In addition, the eluates resulting from tandem affinity purification of AtMPK3 were complex mixtures of proteins. Nevertheless it was possible to identify differences in the composition of the eluates of the control compared to the purification of AtMPK3 after separation on a gradient gel and staining with silver. In one case peptides of AtMPK3 could be identified by MALDI-TOF MS analysis and data bank search using MASCOT. Thus, the isolation and identification of a low abundance protein like AtMPK3 from leave material after affinity purification combined with mass spectroscopy was successful. However, no putative interactors of AtMPK3 could be identified. It remains to be clarified if other techniques used in proteomics like one or more dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectroscopy allow the identification of putative interactors of AtMPK3.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung.....	I
	Summary.....	II
	Inhaltsverzeichnis.....	III
	Abkürzungsverzeichnis.....	VII
	Abbildungsverzeichnis.....	XI
	Tabellenverzeichnis.....	XIII
1	Einleitung.....	1
1.1	Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen.....	1
1.1.1	Die Erkennung des phyto bakteriellen Elizitors Flagellin.....	3
1.1.2	Die Erkennung der weit verbreiteten <i>Nep1-like proteins</i>	3
1.2	MAPK-Kaskaden als Elemente der Signaltransduktion in Eukaryoten.....	4
1.2.1	Die Rolle von MAPK-Kaskaden bei der Signalübertragung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.2.1.1	Aktivierung verschiedener MAPK-Kaskaden durch den Elizitor Flagellin.....	5
1.2.1.2	Die vielseitigen biologischen Funktionen von AtMPK3, 4 und 6.....	7
1.3	Die Regulation der MAPK-Kaskaden in Eukaryoten.....	9
1.3.1	Protein-Protein-Interaktionen als molekulare Basis der Regulation von MAPK-Kaskaden.....	10
1.3.1.1	Das Zusammenspiel von Dockingdomänen.....	10
1.3.1.2	Gerüstproteine als aktive Strukturelemente.....	12
1.3.2	Die Vielfältigkeit der MAPK-Substrate.....	14
1.4	Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen ist ein hoch komplexes Problem.....	15
1.5	Zielsetzung.....	17
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	19
2.1.2	Pflanzen.....	19
2.1.3	Zellsuspensionskulturen.....	20
2.1.4	Bakterienstämme und Plasmide.....	20
2.1.5	Oligonukleotide.....	22
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Behandlung von Pflanzenmaterial.....	22
2.2.1.1	Elizitorbehandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellsuspensionskulturen.....	22

2.2.1.2	Elizitorbehandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen mittels Infiltration.....	22
2.2.1.3	Transiente Expression von NLP aus <i>Phytophthora sojae</i> (NLP _{PS}) in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen.....	22
2.2.1.4	Applikation von Substanzen zur chemischen Vernetzung von Proteinen in Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2.1	Präparation von Plasmiden.....	24
2.2.2.2	Fällung von DNA.....	24
2.2.2.3	Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.2.2.4	Die Polymerase-Kettenreaktion.....	24
2.2.2.5	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	25
2.2.2.6	Transfer von DNA in <i>E.coli</i>	26
2.2.2.7	DNA-Sequenzierung.....	26
2.2.3	Expression und Aufreinigung von Proteinen mit GST-Fusion.....	26
2.2.4	Antikörperproduktion.....	27
2.2.4.1	Gewinnung der Antiseren.....	27
2.2.4.2	Reinigung der Antiseren.....	27
2.2.5	Proteinanalytische Methoden.....	27
2.2.5.1	Proteinextraktion aus Zellkultur- und Blattmaterial.....	27
2.2.5.2	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	28
2.2.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.2.5.4	Ausschlusschromatographie.....	29
2.2.5.5	Tandemaffinitätsreinigung.....	29
2.2.5.6	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	30
2.2.5.6.1	Eindimensionale, denaturierende PAGE.....	30
2.2.5.6.2	Eindimensionale, native PAGE.....	30
2.2.5.6.3	Zweidimensionale, denaturierende PAGE.....	30
2.2.5.7	Visualisierung von Proteinen.....	32
2.2.5.8	Blotten und Immunodetektion von Proteinen.....	33
2.2.5.9	Nachweis der Kinaseaktivität mit Hilfe von Immunopräzipitation.....	34
2.2.5.10	Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF MS.....	35
2.2.6	Computergestützte Analysen.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Herstellung von Antikörpern gegen Proteinkinasen aus ausgewählten MAPK-Kaskaden.....	37
3.2	Hinweise auf die Anwesenheit von AtMPK3 und AtMPK6 in Proteinkomplexen...	42

3.2.1	Auswahl eines geeigneten Extraktionspuffers.....	42
3.2.2	Analyse von Totalproteinextrakten mit Hilfe von Ausschlusschromatographie.....	44
3.2.2.1	Elutionsprofile von AtMPK3 und AtMPK6 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellsuspensionskulturen.....	44
3.2.2.2	Elutionsprofile von AtMPK3 und AtMPK6 aus flg22-behandelten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Blättern.....	47
3.2.2.3	Elutionsprofile von AtMPK3 und AtMPK6 aus NLP _{ps} -behandelten <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern.....	49
3.3	Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> durch mehrdimensionale Trennung von Totalextrakten.....	51
3.4	Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels Tandemaffinitätsreinigung.....	55
3.4.1	Suche nach Möglichkeiten zur Stabilisierung von eventuell instabilen Proteinkomplexen.....	57
3.4.2	Isolierung von TAP-markierter AtMPK3 und mit ihr assoziierter Proteine.....	62
3.4.2.1	Auswahl geeigneter transgener Pflanzenlinien.....	62
3.4.2.2	Optimierung der Tandemaffinitätsreinigung für TAP-markierte AtMPK3.....	64
3.4.2.2.1	Mögliche Bindung von TAP-markierter AtMPK3 an verwendete Kunststoff-Materialien.....	67
3.4.2.2.2	Vergleich der Effizienzen der Tandemaffinitätsreinigungen von AtMPK3-TAP und AtTGA2-TAP.....	68
3.4.2.2.3	Detaillierte Analyse der TAP-Reinigung von AtMPK3-TAP.....	69
3.4.2.2.4	Mögliche Proteolyse der TAP-markierten AtMPK3.....	70
3.4.2.3	Tandemaffinitätsreinigung von TAP-markierter AtMPK3.....	72
3.4.2.4	Aufreinigung von AtMPK3 basierend auf einer einstufigen Affinitätschromatographie.....	77
4	Diskussion.....	83
4.1	MAPK-vermittelte Signalgebung als Summe dynamischer Prozesse.....	83
4.1.1	Erste Informationen über AtMPK3- bzw. AtMPK6-haltige Proteinkomplexe.....	84
4.1.2	Identifizierung putativer AtMPK3- bzw. AtMPK6-Interaktoren basierend auf der Vorfraktionierung von Totalextrakten.....	87
4.2	Analyse von AtMPK3 und eventuell assoziierten Proteinen basierend auf Affinitätschromatographie.....	88
4.2.1	Wie effizient sollte eine Tandemaffinitätsreinigung sein ?.....	88
4.2.2	Mögliche Ursachen für die ineffiziente Aufreinigung von AtMPK3-TAP.....	90
4.2.3	Mögliche Anpassungen in der Handhabung und der Analyse der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proben.....	92
4.2.4	Die Analyse von Proteingemischen aus Affinitätsreinigungen.....	95
4.3	Chancen und Grenzen der genetisch-basierten Analytik am Beispiel der funktionellen Analyse von AtMPK3.....	96

4.4	Perspektiven für die Isolierung von AtMPK3-haltigen Proteinkomplexen.....	101
5	Literaturverzeichnis.....	103
	Danksagung.....	116
	Publikationen und Vorträge.....	117
	Lebenslauf.....	118
	Eidesstattliche Erklärung.....	119

Abkürzungsverzeichnis

1-NA-PP1	4-amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthyl)pyrazolo[3.4-d]pyrimidin
2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
3NT	aus dem N-Terminus von AtMPK3 abgeleitetes Peptid
4NT	aus dem N-Terminus von AtMPK4 abgeleitetes Peptid
6NT	aus dem N-Terminus von AtMPK6 abgeleitetes Peptid
A	Adenosin-Nukleotid
Abb.	Abbildung
ACC	Aminocyclopropan-1-carboxylsäure, Ethylenvorläufer
ACS	ACC-Synthase
ANP1	<i>Arabidopsis</i> NPK1 Homolog
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AT1aR	Angiotensinrezeptor Subtyp 1a
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenzgen/-produkt
B	Blattmaterial
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2, antiapoptotisch
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BN	Blaue Native
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytidin-Nukleotid
CBF3	Transkriptionsfaktor aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , kälteinduziert
CBP	<i>calmodulin binding peptide</i>
CB-Puffer	Calmodulin-Bindungspuffer
CD-Domäne	<i>common docking domain</i>
cDNA	<i>copy (complementary) DNA</i>
CDPK/CPK	Kalzium-abhängige Proteinkinase
CE-Puffer	Calmodulin-Elutionspuffer
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
c-Jun	Protoonkogen, Mitglied der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie
Col	Columbia
COP9	<i>constitutive photomorphogenic 9</i>
c-Raf-1	MAP3K
Cre	Cre-Rekombinase
CSN3	<i>COP9 signalosome complex subunit 3</i>
CTR1	<i>constitutive triple response 1</i>
DEX	Dexamethason
D-Motiv	Dockingmotiv, Konsensussequenz (R/K) _{1,2} -(X) _{2,6} -ϕ-x-ϕ
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DSP	2,2'-Dithiobis(succinimidylpropionat)
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E-64	Cysteinproteasehemmer

EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGTA	Ethylenglycoltetraazetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EREBP	<i>ethylene response element binding protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FLAG	Epitopmarkierung, DYKDDDDK
flg22	22 Aminosäuren langes, synthetisches Peptid, abgeleitet aus dem hochkonservierten N-Terminus von Flagellin
FLS2	<i>flagellin-sensitive 2, receptor-like-kinase</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fus3	MAPK aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , an der Pheromon-induzierten Signalgebung beteiligt
G	Guanosin-Nukleotid
GRK2	Rezeptorkinase
GST	Glutathion-S-transferase
HA	Hemagglutinin-Epitopmarkierung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HOG1	MAPK aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , High osmolarity glycerol 1
hpi	<i>hours post induction</i>
HR	Hypersensitive Reaktion
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IKK γ	regulatorische Untereinheit der I-kappaB Kinase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JIP-1	JNK-interacting protein 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kD	KiloDalton
KNR4	Protein, das an Zellwandsynthese von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> beteiligt ist
Kss1	MAPK aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , an der Pheromon-induzierten Signalgebung und der Kontrolle des Hyphenwachstums beteiligt
LB	Luria-Bertani
LC	<i>liquid chromatography</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography</i> gekoppelt mit Tandemmassenspektroskopie
Ler	Landsberg erecta
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase, besteht aus 2 umgekehrten Sequenzwiederholungen
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
MAMP	<i>Microbe Associated Molecular Pattern</i>
MAP2K	<i>mitogen acitvated protein kinase kinase</i>
MAP3K	<i>mitogen acitvated protein kinase kinase kinase</i>
MAPK	<i>mitogen acitvated protein kinase</i>
MBP	<i>myelin binding protein</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase, andere Bezeichnung für MAP2K
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase, andere Bezeichnung für MAP3K
MG	Molekulargewicht
MKK	andere Bezeichnung für MAP2K
MKP	MAPK-Phosphatase
MKS1	MAP kinase 4 substrate 1

MPK	andere Bezeichnung für MAPK
MS	Massenspektroskopie
MS-Medium	Murashige und Skoog-Medium
MS/MS	Tandemmassenspektroskopie
m/z	Masse/Ladungszahl
NB-LRR	<i>nucleotide-binding/leucine-rich-repeat</i>
NBT	Nitroblue-Tetrazolium
NCL	Nitrocellulose
Nep1	<i>necrosis and ethylene inducing peptide 1</i>
NLP	Nep1-like protein
NLP _{pp}	NLP von <i>Phytophthora parasitica</i>
NLP _{ps}	NLP von <i>Phytophthora sojae</i>
NP 40	Nonidet P-40
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OMTK1	<i>oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>
p38	MAPK
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK1	Serin/Threonin-Proteinkinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PMF	Peptidmassen-Fingerprint
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PR-Gen	<i>pathogenesis related genes</i>
Pto	Resistenzgenprodukt aus Tomate, Proteinkinase
R	Resistenzgen/-produkt
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SGT1b	<i>Arabidopsis</i> Ortholog zu SGT1 aus Hefe
SIPK	<i>salicylic acid-induced protein kinase</i>
SLT2	MAPK aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , die an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt ist
Ste5	Gerüstprotein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Thymin-Nukleotid
Tab.	Tabelle
TAP	<i>tandem affinity purification</i> , Tandemaffinitätsreinigung
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TEY	konserviertes Threonin-Tyrosin-Motiv aus der Aktivierungsschleife der MAPKs
TFA	Trifluoressigsäure
TGA2	Transkriptionsfaktor aus <i>Arabidopsis thaliana</i>

TpEYp	phosphorylierte Form des TEY-Motivs
U	<i>Unit(s)</i> , Einheit(en)
v/v	<i>volume/volume</i>
WIPK	<i>wound-induced protein kinase</i>
WRKY	Transkriptionsfaktoren mit WRKYGQK-Motiv im N-Terminus
Wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>
YODA	MAP3K aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , die an Stomataentwicklung beteiligt ist
YPD	<i>Yeast Protein Database</i>
Z	Zellkulturmaterial

Die proteinogenen Aminosäuren

Name	Abkürzung	Hydrophobizitätsgrad	Charakteristika
Alanin	Ala A	1,8	aliphatisch
Arginin	Arg R	-4,5	basisch, positiv geladen
Asparagin	Asn N	-3,5	polar
Asparaginsäure	Asp D	-3,5	sauer, negativ geladen
Cystein	Cys C	2,5	polar
Glutamin	Gln Q	-3,5	polar
Glutaminsäure	Glu E	-3,5	sauer, negativ geladen
Glyzin	Gly G	-0,4	aliphatisch
Histidin	His H	-3,2	basisch, positiv geladen
Isoleucin	Ile I	4,5	aliphatisch
Leucin	Leu L	3,8	aliphatisch
Lysin	Lys K	-3,9	basisch, positiv geladen
Methionin	Met M	1,9	polar, aliphatisch
Phenylalanin	Phe F	2,8	aromatisch
Prolin	Pro P	-1,6	
Serin	Ser S	-0,8	polar
Threonin	Thr T	-0,7	polar
Tryptophan	Trp W	-0,9	aromatisch
Tyrosin	Tyr Y	-1,3	aromatisch
Valin	Val V	4,2	aliphatisch

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Durch den Elizitor flg22 aktivierte MAPK-Kaskaden in <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Abb. 1.2	Weitere MAPK-Kaskaden aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , die zumindest teilweise bekannt sind.....	8
Abb. 1.3	Verschiedene Mechanismen, welche die Selektivität von MAPKs ermöglichen...	10
Abb. 1.4	Funktionen von Gerüstproteinen in der MAPK-Signalgebung.....	12
Abb. 3.1	Sequenzvergleich aller 20 (putativen) MAPKs aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
Abb. 3.2	Spezifität der Antikörper gegen AtMPK3, 4 und 6 gezeigt anhand der Erkennung der rekombinanten Fusionsproteine GST-AtMPK3, 4 und 6.....	39
Abb. 3.3	Spezifität des Antikörpers gegen AtMPK3 gezeigt anhand der Erkennung von AtMPK3 aus Zellkultur- und Blattmaterial.....	40
Abb. 3.4	Spezifität des Antikörpers gegen AtMPK4 gezeigt anhand der Erkennung von AtMPK4 aus Zellkultur- und Blattmaterial.....	41
Abb. 3.5	Spezifität des Antikörpers gegen AtMPK6 gezeigt anhand der Erkennung von AtMPK6 aus Zellkultur- und Blattmaterial.....	41
Abb. 3.6	Einfluss von Detergenzien auf die Effizienz der Extraktion von AtMPK3 und 6 aus unbehandeltem sowie flg22-behandeltem Zellkultur- und Blattmaterial.....	44
Abb. 3.7	AtMPK3 und 6 sind in <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellsuspensionskulturen wahrscheinlich Bestandteil von Multiproteinkomplexen.....	46
Abb. 3.8	AtMPK3 bzw. 6 sind in <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern nicht bzw. nur zu einem wahrscheinlich geringen Anteil Bestandteil von Multiproteinkomplexen.....	48
Abb. 3.9	Aktivierung von AtMPK3 und 6 durch das Protein NLP _{ps}	49
Abb. 3.10	AtMPK3 bzw. 6 sind in <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern nicht bzw. nur zu einem wahrscheinlich geringen Anteil Bestandteil von Multiproteinkomplexen.....	50
Abb. 3.11	Möglicher Arbeitsablauf zur Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> durch vergleichende Proteomanalyse von Pflanzenmaterial des Wildtyps und der <i>knock out</i> -Linien <i>mpk3</i> und <i>mpk6</i>	52
Abb. 3.12	Vergleichende Analyse von Proteinen aus Totalextrakten der Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia.....	54
Abb. 3.13	Arbeitsablauf zur Optimierung der Isolierung und Identifizierung von mit AtMPK3 assoziierten Proteinen.....	56
Abb. 3.14	Applikation von HCHO auf <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels Vakuuminfiltration (A), Flottieren (B) und Sprühen (C).....	60
Abb. 3.15	Applikation von DSP auf <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels Vakuuminfiltration (A), Flottieren (B) und Sprühen (C).....	61
Abb. 3.16	Expression und Funktionalität von TAP-markierter AtMPK3.....	63
Abb. 3.17	Arbeitsablauf der Tandemaffinitätsreinigung und für die Aufreinigung von AtMPK3-TAP angewandte Bedingungen.....	65
Abb. 3.18	Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3.....	66
Abb. 3.19	Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3 und AtTGA2.....	69
Abb. 3.20	Detaillierte Analyse der Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3.....	70

Abb. 3.21	Untersuchung von AtMPK3 mit Blick auf eine mögliche Proteolyse durch die AcTEV TM -Protease.....	71
Abb. 3.22	Vergleich der Elutionseffizienz von an IgG-Sepharose gebundener AtMPK3-TAP nach TEV-Verdau unter Anwesenheit von verschiedenen TEV-Protease kompatiblen Proteaseinhibitoren.....	72
Abb. 3.23	Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3-TAP ausgehend von 420 mg Gesamtprotein.....	73
Abb. 3.24	Ergebnis der MALDI-TOF MS-Analyse von Bande 2-2, die aus dem in Abbildung 3.23. dargestellten Proteingel isoliert wurde.....	75
Abb. 3.25	2D-Gelelektrophorese der IgG-Untereinheiten, welche durch Veränderung des pH-Wertes von der IgG-Sepharose gelöst werden.....	78
Abb. 3.26	Vergleich der Expressionsniveaus und der Effizienz der Aufreinigung von TAP-Protein und AtMPK3-TAP.....	79
Abb. 3.27	Analyse der einstufigen Aufreinigung durch 2D-Gelelektrophorese gefolgt von Immunoblotanalyse und Silberfärbung.....	81
Abb. 3.28	Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der beiden in der Vektorkontrolle angereicherten Proteine.....	82
Abb. 4.1	Anpassungen in der Handhabung und der Analyse der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proben.....	93
Abb. 4.2	Offenlegung von neuen Funktionen der AtMPK3 durch Kombination von klassischer Nullmutantenanalyse, induzierbarer RNA-Interferenz (RNAi) und chemischer Interferenz.....	99

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Methoden der Proteomik zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von MAPKs.....	17
Tab. 2.1	Verwendete Pflanzen.....	20
Tab. 2.2	Verwendete Bakterienstämme.....	21
Tab. 2.3	Verwendete Plasmide.....	21
Tab. 2.4	Verwendete Plasmide mit Insert.....	21
Tab. 2.5	Verwendete Oligonukleotide.....	22
Tab. 2.6	Verwendetes PCR-Programm.....	25
Tab. 2.7	Zusammensetzung des Kinaseextraktionspuffers.....	28
Tab. 3.1	Beschreibung der für die chemische Vernetzung benutzten Substanzen HCHO und DSP.....	58
Tab. 4.1	Überblick über die Klassifizierung der Proteasen in Anlehnung an die Datenbank des <i>Expasy Proteomics Servers</i>	91

1 Einleitung

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* umfasst mehr als 25.000 Gene (The_Arabidopsis_Genome_Initiative, 2000). Damit sich aus dieser Vielzahl von Genen eine Pflanze entwickeln und gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen behaupten kann, ist eine genaue Abstimmung aller zellulären Funktionen über Netzwerke in der Signaltransduktion, im Stoffwechsel, im Zytoskelett und anderen Bereichen erforderlich. Das Signalnetzwerk von *Arabidopsis thaliana* enthält auch die Gene für 1.019 Kinasen (Wang et al., 2003) und 112 Phosphatasen (Kerk et al., 2002). Die Aktivität dieser Komponenten des Signalnetzes kann die Aktivierung oder Inhibierung von mehr als 1.500 Transkriptionsfaktoren (Riechmann et al., 2000) beeinflussen.

Die Komplexität von Netzwerken aller Art wird zusätzlich dadurch erhöht, dass die im Organismus vorliegende Anzahl an Proteinen die Anzahl an Genen um ein Vielfaches übersteigt. Regulationsmechanismen für die Zahl der intrazellulären Komponenten findet man auf posttranskriptionaler Ebene in Form von alternativem Spleißen sowie als posttranslationale Modifizierungen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung.

Ferner werden durch Signalgebung nicht nur die vom Entwicklungsprogramm der Pflanze vorgegebenen Prozesse gesteuert, sondern die Pflanze reagiert mit Hilfe ihres Signalnetzwerkes auch auf alle auf sie einwirkenden abiotischen und biotischen Umweltfaktoren. Dadurch wird gewährleistet, dass sich Pflanzen an die jeweiligen Standortbedingungen anpassen können und gegebenenfalls Schutz- und Abwehrreaktionen veranlasst werden. Zu den abiotischen Stressoren gehören unter anderem Kälte und Hitze, Überschwemmung und Dürre sowie hohe Salinität und Nährstoffmangel. Biotischer Stress wird beispielsweise durch Pathogene wie Bakterien und Pilze sowie durch Fraßfeinde ausgelöst.

1.1 Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen

Effektoren, Elizitoren und Toxine sind Moleküle, welche die Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen beeinflussen. Effektorproteine werden von den verschiedensten Pathogenen in die Pflanze abgegeben. Viele der Effektoren sind anschließend wahrscheinlich an der Unterdrückung der Immunantwort der Pflanze beteiligt (Jones and Dangl, 2006). Somit sind Effektoren als Virulenzfaktoren für die Pathogenität von Pflanzenpathogenen von großer Bedeutung. Es existiert allerdings auch eine Klasse phytopathogener Effektoren, die von

resistenten Pflanzen erkannt wird. Dadurch wird die Virulenz des Pathogens negativ beeinflusst und diese Virulenzfaktoren werden daher als Avirulenzfaktoren (Avr-Faktoren) bezeichnet. Elizitoren sind Moleküle, die während der Pflanzen-Pathogen-Interaktion freigesetzt werden und im Wirt Abwehrreaktionen induzieren (Gijzen and Nurnberger, 2006). Sind die Elizitoren pflanzlicher Herkunft (z.B. Fragmente der pflanzlichen Zellwand), werden sie als endogene Elizitoren bezeichnet. Als Elizitoren wirkende Bestandteile von Pathogenen stellen hingegen exogene Elizitoren dar. In der Vergangenheit zeigte sich, dass die Elizitormoleküle in Bezug auf Struktur und Aktivität eine breite Varianz aufweisen. So werden beispielsweise mikrobiell- oder pathogen-assoziierte molekulare Muster (MAMPs oder PAMPs), die strukturelle Komponenten oder Enzyme des Pathogens darstellen, von Pflanzen erkannt (Gijzen and Nurnberger, 2006). Bei Toxinen handelt es sich um von Mikroorganismen produzierte unspezifische Verbindungen, welche für Pflanzen und Tiere giftig sind (Gijzen and Nurnberger, 2006). Diese Diversität von Effektoren, Elizitoren und Toxinen beeinflusst entscheidend das Wirtsspektrum des Pathogens.

Für die Pathogenabwehr sind Pflanzen auf die jeder Zelle innewohnende Immunität und auf die von der Infektionsstelle ausgehende Verbreitung von systemischen Signalen angewiesen. Das pflanzliche Immunsystem gliedert sich im wesentlichen in zwei Teile (Jones and Dangl, 2006). Zum einen werden bei der basalen Abwehr MAMPs bzw. PAMPs mit Hilfe von membranüberspannenden Rezeptoren erkannt. Zum anderen erfolgt die Erkennung der von den Pathogenen in die Pflanzenzelle abgegebenen Avr-Proteinen durch polymorphe NB-LRR-Proteine, die von Resistenzgenen (R-Genen) kodiert werden.

Nach dem ersten Kontakt zwischen Pathogen und Pflanze werden verschiedene Abwehrreaktionen aktiviert. Zuerst kommt es innerhalb von Minuten zur rezeptorvermittelten Erkennung von MAMPs bzw. PAMPs. Im Rahmen dieser basalen Abwehr erfolgt unter anderem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die Aktivierung von *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), die Erhöhung der Expression von PR-Genen und die Auflagerung von Kallose auf die Zellwand (Abramovitch et al., 2006). Infolgedessen kann eine weitere Ausbreitung des Pathogens unterbunden werden. Erfolgreiche Pathogene sind hingegen in einem nächsten Schritt dazu befähigt, Proteine zu sezernieren, welche zur Virulenz des Pathogens beitragen. Diese Proteine können mit der durch die MAMPs bzw. PAMPs ausgelösten Immunität interferieren (Jones and Dangl, 2006). Im weiteren Verlauf der Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze kann es zu einer Erkennung von Virulenzfaktoren (Avr-Proteine) innerhalb der Pflanzenzelle durch polymorphe NB-LRR-Proteine kommen, was in der Ausprägung einer Resistenz resultiert. Durch diese R-Gen vermittelte Abwehrreaktion werden zum Teil ähnliche Antworten wie bei der basalen Abwehr induziert. Zusätzlich kommt

es jedoch an der Infektionsstelle zu einem lokal begrenzten, programmierten Zelltod, der als Hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird (Abramovitch et al., 2006). Durch natürliche Auslese werden Pathogene selektiert, die in der Lage sind durch Veränderung und/oder Maskierung ihrer Virulenzfaktoren die R-Gen vermittelte Resistenz zu umgehen. Dadurch wird auf Seiten der Pflanzen die Selektion nach neuen Resistenzspezifitäten vorangetrieben (Jones and Dangl, 2006).

1.1.1 Die Erkennung des phyto bakteriellen Elizitors Flagellin

Zur Fortbewegung nutzen Bakterien Flagellen, welche mit einem Motorkomplex in der Zellmembran verankert sind und aus Tausenden Einheiten des Proteins Flagellin bestehen. Die N- und C-terminalen Bereiche des Flagellins aus verschiedenen Bakterien sind sehr konserviert. Somit ist Flagellin ein idealer Kandidat für ein PAMP (Gomez-Gomez and Boller, 2002). Durch Studien an Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana* und Tomate konnte gezeigt werden, dass Pflanzen über ein hochsensitives Perzeptionssystem für Flagellin verfügen und dass insbesondere ein hochkonservierter N-terminaler Bereich erkannt wird (Felix et al., 1999). Für weitere Untersuchung wurde daher meist ein 22 Aminosäuren langes Peptid aus dem N-Terminus von Flagellin eingesetzt, welches im folgenden als flg22 bezeichnet wird.

Nach EMS-Mutagenese und der Isolierung von flg22-insensitiven Mutanten konnte über *map-based cloning* ein Gen für einen putativen, als FLS2 bezeichneten flg22-Rezeptor identifiziert werden (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Später wurde mittels chemischer Vernetzung und Immunfällung die direkte Bindung von flg22 an das FLS2-Protein bewiesen (Chinchilla et al., 2006). Lokalisierungsstudien mit Hilfe von funktionellem, GFP-markiertem FLS2 zeigten, dass FLS2 in der Zellmembran von nahezu allen Geweben vorhanden ist und dass nach der Aktivierung durch flg22 eine Liganden-induzierte Endozytose stattfindet (Robatzek et al., 2006). Die Aufnahme des FLS2-Rezeptors in die Epidermiszellen geschieht in Abhängigkeit vom Zytoskelett und vom Proteasom.

Die Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit flg22 löst in den Zellen eine Vielzahl von Reaktionen wie die transkriptionelle Induzierung von nahezu 1.000 Genen, die Aktivierung der *Arabidopsis thaliana* MAPKs 3, 4 und 6 sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies aus (Asai et al., 2002; Gomez-Gomez and Boller, 2002; Droillard et al., 2004; Zipfel et al., 2004; Meszaros et al., 2006). Außerdem kommt es nach der Applikation einer flg22-Lösung, einer Suspension von *Escherichia coli* bzw. eines virulenten *Pseudomonas syringae*-Stammes auf die Oberfläche von *Arabidopsis*-Blättern zur Schließung der Spaltöffnungen (Melotto et al., 2006). Die Erkennung von flg22 selber oder als Bestandteil eines Bakteriums führt also zum Verschluss von Spaltöffnungen, die Pathogene für ihren Eintritt in die Pflanze nutzen.

1.1.2 Die Erkennung der weit verbreiteten *Nep1-like proteins*

Nep1-like proteins (NLPs) sind nach *Nep1* (*necrosis and ethylene inducing peptide 1*) aus *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxyli* benannt und werden von verschiedenen Bakterien, Pilzen und Oomyceten sekretiert (Qutob et al., 2006). NLPs verschiedener Oomyceten lösen in Pflanzen neben dem Zelltod ein breites Spektrum von Reaktionen wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Phytoalexinen, die Aktivierung von MAPKs sowie die weitreichende Umstellungen der Transkription aus (Qutob et al., 2006).

Ungeklärt ist bisher die Art und Weise der Erkennung der NLPs durch die Pflanzen. Bisher ist kein Rezeptor für NLPs bekannt. NLPs könnten zudem als Toxine wirken, indem sie in der Plasmamembran Poren bilden oder mit essentiellen, in der Plasmamembran lokalisierten Zielmolekülen interagieren (Gijzen and Nurnberger, 2006). Versuche, einen NLP-Rezeptor zu identifizieren bzw. Beschädigungen an der Plasmamembran nachzuweisen, schlugen fehl. Mit dem bisher gesammelten Wissen über die Wirkung von NLPs in Pflanzen lässt sich sowohl eine Aktivität als Elizitor als auch eine Aktivität als Toxin begründen. Einerseits lösen NLPs in Pflanzen eine Vielzahl von Immunantworten ähnlich dem Elizitor flg22 aus (Qutob et al., 2006). Andererseits verfügen NLPs über eine zytolytische Aktivität. Zudem geht der Übergang vom biotrophen zum nekrotrophen Lebensstil des Pathogens *Phytophthora sojae* (Ps) während der Infektion von Sojabohnen mit einer Akkumulation des Transkripts von NLP_{Ps} einher (Qutob et al., 2002; Gijzen and Nurnberger, 2006).

1.2 MAPK-Kaskaden als Elemente der Signaltransduktion in Eukaryoten

Bei den *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) handelt es sich um eine Subklasse der Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Proteinkinasen. Die MAPKs sind als Teil von universellen Modulen der Signalgebung in Eukaryoten an der Übertragung von extrazellulären Signalen in intrazelluläre Antworten beteiligt. Die Aktivierung der MAPKs erfolgt über eine lineare Kaskade von nacheinander agierenden Proteinkinasen, welche sequentielle Phosphorylierungsreaktionen vermitteln. Die MAPK als letzte Komponente der Serie wird durch Phosphorylierung eines konservierten Threonin-X-Tyrosin-Motivs durch eine MAP2K aktiviert, wobei das X für Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D), Glyzin (G) oder Prolin (P) stehen kann. In Pflanzen konnten bisher nur MAPKs mit einem TEY- oder TDY-Motiv identifiziert werden (MAPK-Group, 2002). Die *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAP2K) wiederum wird durch Phosphorylierung von zwei Serin/Threonin-Resten durch den vorgelagerten Aktivator *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAP3K) reguliert (Nakagami et al., 2005).

In Tieren, Hefen und Pflanzen sind MAPK-Kaskaden sowohl während der Entwicklung des jeweiligen Organismus als auch im Rahmen von Stressantworten aktiv. In Larven und Puppen von *Drosophila* entscheidet die subzelluläre Lokalisierung einer MAPK im sich entwickelnden Flügel über Zellteilung und Zelldifferenzierung (Marenda et al., 2006). In Säugern werden fünf verschiedene Untergruppen von MAPKs unterschieden, wovon die JNK- und p38-Isoformen vorzugsweise auf Stressstimuli wie osmotischen Schock und Strahlung reagieren (Pearson et al., 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* wird die MAPK Fus3 bei der Signaltransduktion während der Paarung (*mating*) aktiviert, welche durch Pheromone induziert wird. Im Gegensatz dazu veranlasst die Aktivierung einer Kaskade um die MAPK Hog1 durch hohe Osmolarität die Hefezellen zur Produktion von Osmolyten (Madhani and Fink, 1998). In *Arabidopsis thaliana* wird die Entwicklung der Spaltöffnungen und ihre Verteilung auf dem Blatt über die MAP3K YODA gesteuert (Bergmann et al., 2004). Außerdem führt sowohl biotischer als auch abiotischer Stress in Pflanzen zur Aktivierung von verschiedenen MAPK-Kaskaden (Mishra et al., 2006).

1.2.1 Die Rolle von MAPK-Kaskaden bei der Signalübertragung in *Arabidopsis thaliana*

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* konnten durch Sequenzanalyse 20 für (putative) MAPKs kodierende Gene, 10 für (putative) MAP2Ks kodierende Gene sowie etwa 60 für (putative) MAP3Ks kodierende Gene identifiziert werden (MAPK-Group, 2002). Die MAP3Ks sind dabei durch eine große Vielfalt an primären Strukturen und Domänen gekennzeichnet. Aufgrund der Vielzahl an putativen MAPKs, MAP2Ks und MAP3Ks stellt die Aufklärung von einzelnen, durch verschiedene Stimuli induzierten MAPK-Kaskaden, eine große Herausforderung dar. Gemessen an der theoretisch möglichen Anzahl verschiedener Kombinationen für die Zusammenstellung von MAPK-Kaskaden in *Arabidopsis thaliana* wurde bisher nur eine verschwindend geringe Anzahl von Kaskaden identifiziert (Abbildungen 1.1 und 1.2).

1.2.1.1 Aktivierung verschiedener MAPK-Kaskaden durch den Elizitor Flagellin

Nach der Isolierung der ersten cDNA einer MAPK aus Pflanzen, welche eine 50%ige Identität zu MAPKs aus Hefe und Wirbeltieren aufwies (Stafstrom et al., 1993), dauerte es noch einmal fast zehn Jahre bis zur Offenlegung der ersten vollständigen MAPK-Kaskade aus Pflanzen. Durch transiente Expression von verschiedenen Kinasen in Mesophyllprotoplasten von *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von flg22 durch den Rezeptor FLS2 zur Aktivierung einer Kaskade bestehend aus der MAP3K AtMEKK1, der MAP2K AtMKK4/5 und der MAPK AtMPK3/6 führt (Asai et al., 2002)(Abb. 1.1). Etwas

später wurde zudem erstmals die Aktivierung der AtMPK4 durch flg22 beschrieben (Droillard et al., 2004) und es begann die Suche nach der MAPK-Kaskade, über welche die Phosphorylierung von AtMPK4 erfolgt. Mit Hilfe von Methoden, die auf dem Ansatz der *reverse genetics* beruhen, gelang die Identifizierung einer AtMPK4-Kaskade, an der AtMEKK1 und AtMCK1 beteiligt sind (Ichimura et al., 2006; Meszaros et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007)(Abb. 1.1).

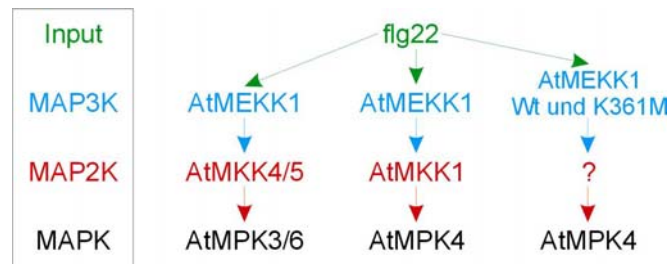


Abb. 1.1 Durch den Elizitor flg22 aktivierte MAPK-Kaskaden in *Arabidopsis thaliana*. Asai et al. (2002) postulierten eine Kaskade ausgehend von AtMEKK1, in der die MAPKs AtMPK3 und 6 durch die MAP2Ks AtMCK4 und 5 aktiviert werden. Drei weitere Arbeiten zu flg22-induzierten MAPK-Kaskaden legten später eine Rolle von AtMEKK1 bei der Aktivierung der AtMPK4 durch flg22 offen (Ichimura et al., 2006; Meszaros et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Meszaros et al. (2006) zeigten, dass in diesem Fall eine Kaskade bestehend aus AtMEKK1, AtMCK1 und AtMPK4 vorlag. Außerdem wurde AtMPK4 nicht nur bei Anwesenheit der Wildtypform (Wt) von AtMEKK1 sondern auch im Beisein einer kinaseinaktiven Form von AtMEKK1 (K361M) phosphoryliert (Suarez-Rodriguez et al., 2007).

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage nach den Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse der genannten Studien. Einerseits untersuchten Asai et al. (2002) in ihrer Studie nur die AtMPKs 2, 3, 5, 6, 7 und 9. Andererseits nutzte die Gruppe um Asai und Sheen für ihre Versuche eine verkürzte, konstitutiv aktive Form von AtMEKK1, bei der eine aus 325 Aminosäure bestehende regulatorische Domäne deletiert war. Diese regulatorische Domäne interagiert im Hefe-2-Hybridsystem jedoch mit AtMPK4 und nicht mit AtMPK3 bzw. 6 (Ichimura et al., 1998). *In planta* besteht daher die Möglichkeit, dass der regulatorische AtMEKK1-Bereich die Interaktionen der verschiedenen MAPKs mit der MAP3K AtMEKK1 steuert (Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Zudem wurden die Komponenten der MAPK-Kaskade in den Mesophyllprotoplasten überexprimiert, was zu einer Aktivierung ähnlicher aber unter physiologischen Gesichtspunkten nicht relevanter Kinasen führen könnte.

In *mekk1*-Mutanten führt die Behandlung der Pflanzen mit flg22 weiterhin zur Aktivierung von AtMPK3 und 6 aber nicht von AtMPK4 (Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Die Entbehrlichkeit von AtMEKK1 für die Aktivierung von AtMPK3 und 6 weist daraufhin, dass diese MAPKs nach der Erkennung von flg22 über andere MAP3Ks aktiviert werden können (Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007).

Interessanterweise ist die flg22-induzierte Aktivierung von AtMPK4 unabhängig von der Kinaseaktivität von AtMEKK1 und erfolgt auch in Pflanzen, die eine kinaseinaktive Version von AtMEKK1 exprimieren (AtMEKK1 K361M) (Suarez-Rodriguez et al., 2007). Folglich besteht die Möglichkeit, dass die Aktivierung der Kaskade aus AtMEKK1, AtMKK1 und AtMPK4 durch eine andere MAP3K substituiert werden kann. Für die Funktion der AtMEKK1 als Strukturelement scheint es jedoch keinen Ersatz zu geben (Suarez-Rodriguez et al., 2007).

In *knock out*-Linien für die MAP2K AtMKK1 ist nicht nur die flg22-induzierte Aktivierung von AtMPK4 reduziert sondern auch die Aktivierung von AtMPK3 und 6 (Meszaros et al., 2006). Daraus ergibt sich die Frage nach einer möglichen Kopplung der über AtMPK4 sowie AtMPK3 und 6 verlaufenden Signalkaskaden. Meszaros et al. (2006) stellten dafür zwei verschiedene Arbeitshypothesen auf. Zum einen das Modell der sequentiellen Aktivierung, bei dem AtMEKK1 an AtMKK1 und AtMPK4 bindet und die Bindungspartner erst nach Aktivierung von AtMPK4 dissoziieren. Nach ihrer Freisetzung kann die MAP3K AtMEKK1 dann die Signalkaskade bestehend aus AtMKK4/5 und AtMPK3/6 aktivieren (Meszaros et al., 2006). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass ein Komplex aus AtMEKK1 und AtMPK4 auch die AtMKK4 und 5 bindet. Die Freisetzung von AtMKK4 und 5 und damit die Aktivierung des AtMPK3/6-Signalweges würde dann erst nach Aktivierung der AtMPK4 durch AtMKK1 und der anschließenden Dissoziation des AtMEKK1-AtMKK4/5-AtMPK4-Komplexes erfolgen (Meszaros et al., 2006).

Da der Phänotyp von *mekk1*- und *mpk4*-Pflanzen unter anderem mit der konstitutiven Expression von PR-Genen verbunden ist (Petersen et al., 2000; Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007), werden AtMEKK1 und AtMPK4 als negative Regulatoren von Signalwegen definiert, welche an der Pathogenantwort beteiligt sind. Im Gegensatz dazu agieren AtMPK3 und 6 als positive Regulatoren. Eine über den FLS2-Rezeptor erfolgende, gleichzeitige Aktivierung von positiven und negativen Regulatoren bietet die Möglichkeit einer genau abgestimmten Kontrolle der aus einer Anregung mit flg22 resultierenden Reaktionen (Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007).

1.2.1.2 Die vielseitigen biologischen Funktionen von AtMPK3, 4 und 6

Es gibt in *Arabidopsis thaliana* wesentlich mehr (putative) MAP3Ks bzw. (putative) MAPKs als (putative) MAP2Ks. Darum wird angenommen, dass auf der Ebene der MAP2Ks die durch die MAP3Ks weitergeleiteten Signale gebündelt und über MAPKs in spezifische Outputs umgewandelt werden (Meszaros et al., 2006). Mit Hilfe der identifizierten MAPK-Kaskaden konnte diese Annahme bisher jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich, dass viele verschiedene Signale dasselbe Set MAPKs aktivieren und die bisher untersuchten MAP3Ks

zum Teil eine Funktion in mehreren MAPK-Kaskaden aufweisen (Nakagami et al., 2005) (Abb. 1.1 und 1.2).

Die MAPK AtMPK3 ist offenbar an so diversen Prozessen wie osmotischem und oxidativem Stress sowie flg22- bzw. ABA-induzierter Signalgebung beteiligt (Nakagami et al., 2005). Dabei erfolgt nach Behandlung von Mesophyllprotoplasten mit H₂O₂ neben der Aktivierung von AtMPK3 auch die Aktivierung von AtMPK6 über die MAP3K AtANP1 (Kovtun et al., 2000) (Abb. 1.2 A). Außerdem konnte durch Analyse zahlreicher *loss-of-function* Mutanten gezeigt werden, dass die Entwicklung der Stomata über ein MAPK-Modul bestehend aus AtYODA-AtMKK4/5-AtMPK3/6 geregelt wird (Wang et al., 2007)(Abb. 1.2 A).

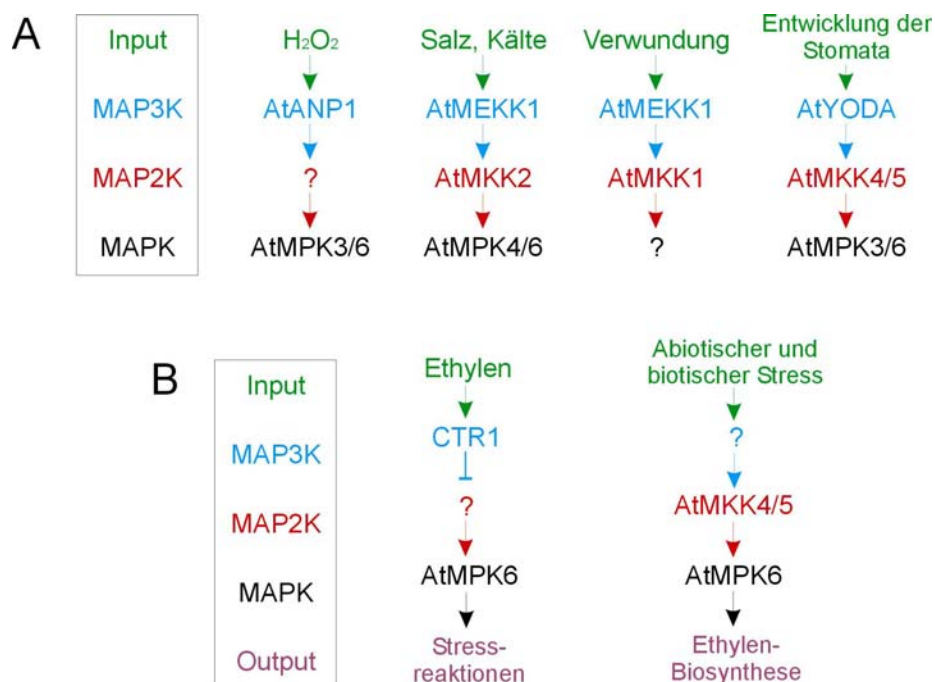


Abb. 1.2 Weitere MAPK-Kaskaden aus *Arabidopsis thaliana*, die zumindest teilweise bekannt sind. **(A)** Die MAP3K AtMEKK1 sowie die MAPKs AtMPK3, 4 und 6 werden durch sehr verschiedene Stimuli aktiviert (Kovtun et al., 2000; Teige et al., 2004; Hadiarto et al., 2006; Wang et al., 2007). **(B)** Es gibt sowohl Hinweise auf eine Beteiligung von AtMPK6 an der Ethylen-induzierten Signalgebung (Ouaked et al., 2003) als auch an der Regulation der Ethylen-Biosynthese (Liu and Zhang, 2004).

Die Aktivierung von AtMPK4 kann nach Kälte- und Trockenstress, hyperosmotischem Schock, Berührung und Verwundung sowie im Zusammenhang mit Resistenz gegen Pathogene nachgewiesen werden (Nakagami et al., 2005). Die Signalgebung bei Kälte- und Salzstress wird über AtMEKK1 und AtMKK2 gesteuert (Teige et al., 2004)(Abb. 1.2 A). Ferner wird über dieselbe MAPK-Kaskade AtMPK6 aktiviert.

Über die bereits genannten Inputs hinaus führen auch Trockenstress, Berührung, Verwundung und Pathogenbefall zu einer Aktivierung von AtMPK6 (Nakagami et al., 2005). Es ist allerdings nicht immer bekannt, über welche MAPK-Kaskaden die AtMPK6-Aktivierung bei diesen Stressreaktionen erfolgt. Da nach Verwundung von *Arabidopsis thaliana* AtMEKK1

aktiviert wird und nachfolgend AtMKK1 phosphoryliert (Hadiarto et al., 2006)(Abb. 1.2 A), könnte die Aktivierung von AtMPK6 nach Verwundung über diese Kaskade erfolgen.

Zudem gibt es sowohl Hinweise für eine Beteiligung von AtMPK6 an der Ethylen-induzierten Signalgebung (Ouaked et al., 2003) als auch an der Regulation der Ethylen-Biosynthese (Liu and Zhang, 2004). Basierend auf biochemischen und genetischen Studien wurde postuliert, dass AtMPK6 an einer Ethylen-induzierten, von CTR1 gesteuerten MAPK-Kaskade involviert ist (Ouaked et al., 2003). Da es sich bei CTR1 um einen negativen Regulator der Ethylen-Signalgebung handelt, läge eine außergewöhnliche MAPK-Kaskade vor, bei der eine Stufe die nächste Stufe hemmen würde. Die Regel stellen jedoch MAPK-Signalwege dar, bei denen jeder Schritt positiv reguliert wird. Im Gegensatz dazu lieferte eine andere Studie Hinweise darauf, dass die durch abiotischen und biotischen Stress induzierte Ethylen-Biosynthese über eine AtMPK6-abhängige MAPK-Kaskade reguliert wird (Liu and Zhang, 2004). Danach wäre die Existenz eines MAPK-Moduls, an dessen Aufbau CTR1 beteiligt ist weiter ungeklärt.

Insgesamt wird am Beispiel der vielfältigen biologischen Funktionen von AtMPK3, 4 und 6 die Notwendigkeit für eine genaue Regulation der MAPKs und der entsprechenden MAPK-Kaskaden deutlich.

1.3 Die Regulation der MAPK-Kaskaden in Eukaryoten

Die Überlebensfähigkeit eines Organismus wird dadurch gesichert, dass die in den Zellen vorhandenen Moleküle ihre Aufgaben zur richtigen Zeit und am richtigen Ort allein oder über Interaktionen mit anderen Molekülen erfüllen. So trägt beispielsweise die spezifische Erkennung des Substrates durch das aktive Zentrum einer MAPK zur Ausprägung von Selektivität in Signalgebungsprozessen bei (Bhattacharyya et al., 2006a). Neuere Studien in Hefe und Säugern verweisen jedoch auf Mechanismen zur Erzeugung von Spezifität, welche über die Enzym-Substrat-Interaktion hinausgehen (Abb. 1.3). So spielen beispielsweise auch die Interaktionen über Dockingdomänen und Gerüstproteine eine entscheidende Rolle bei der Regulation von MAPK-Kaskaden. Im Gegensatz zur Situation in Hefe und Säugern sind in Pflanzen nur sehr wenige Erkenntnisse darüber vorhanden, wie Spezifität bei der Signaltransduktion durch MAPK-Kaskaden erreicht wird.

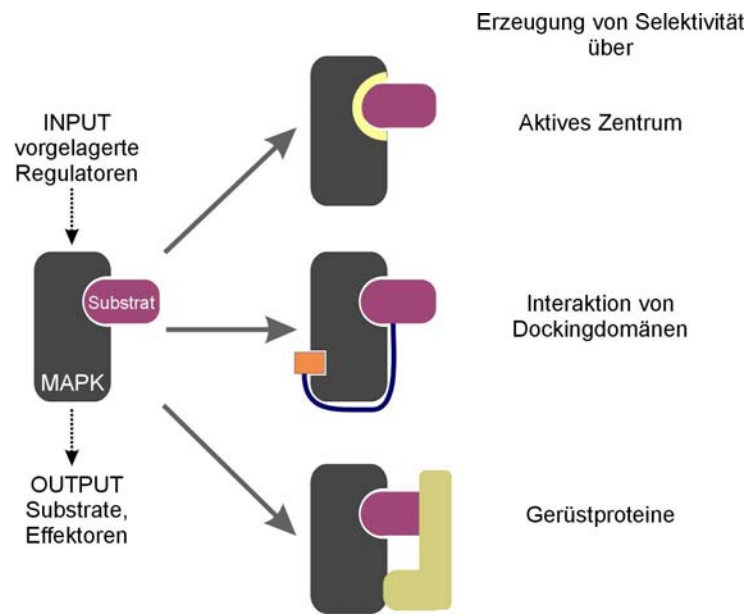


Abb. 1.3 Verschiedene Mechanismen, welche die Selektivität von MAPKs ermöglichen. Einerseits entscheidet die Kompatibilität des Substrates mit dem aktiven Zentrum der MAPK über eine mögliche Interaktion der beiden Proteine. Andererseits tragen auch andere Bereiche auf der Oberfläche von MAPKs und den MAPK-assoziierten Proteinen in Form von Dockingdomänen zur Erzeugung der Selektivität bei. Hier ist die Interaktion über Dockingdomänen am Beispiel der Wechselwirkung einer MAPK mit ihrem Substrat gezeigt. Außerdem können Gerüstproteine MAPKs mit ihren vor- oder nachgelagerten Partnern komplexieren und so die Spezifität der MAPK-Signalgebung regulieren. (Abbildung erstellt in Anlehnung an Bhattacharyya et al. 2006a)

1.3.1 Protein-Protein-Interaktionen als molekulare Basis der Regulation von MAPK-Kaskaden

1.3.1.1 Das Zusammenspiel von Dockingdomänen

Viele Proteinkinasen und -phosphatasen sowohl aus Hefen als auch aus Tieren nutzen Teile ihrer Oberfläche außerhalb des aktiven Zentrums für die spezifische Interaktion mit positiven und negativen Regulatoren sowie mit Substraten (Remenyi et al., 2006). Vermittelt werden derartige Protein-Protein-Interaktionen zum Beispiel über Dockingdomänen, welche sich bei MAPKs und MAPK-interagierenden Proteinen in konservierten Regionen befinden (Tanoue and Nishida, 2003)(Abb.1.3).

Die Bindestelle auf Seiten der MAPK wird als *common docking domain* (CD-Domäne) bezeichnet und stellt eine evolutionär konservierte Region saurer, negativ geladener Aminosäuren dar. Die CD-Domäne befindet sich im C-Terminus der MAPK (Remenyi et al., 2006). Das Gegenstück zur CD-Domäne ist ein kurzes lineares Dockingmotiv, welches in den MAPK-interagierenden Proteinen lokalisiert ist. Von den drei bis zehn Aminosäuren des Dockingmotivs sind jedoch nur wenige für die Andockfunktion essentiell. Das am besten charakterisierte Dockingmotiv ist das D-Motiv mit der Konsensussequenz $(R/K)_{1-2}-(X)_{2-6}-\Phi-X-\Phi$, wobei Φ eine hydrophobe Aminosäure bezeichnet (Remenyi et al., 2006).

Vergleichende Analysen legen einen konservierten, auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhenden Interaktionsmechanismus nahe. Dabei binden die basischen, positiv geladenen Reste des D-Motivs im interagierenden Protein an die negativ geladene Oberfläche der CD-Domäne der MAPK. Zusätzlich interagieren die hydrophoben Aminosäuren des D-Motivs mit einer hydrophoben Tasche auf der MAPK (Remenyi et al., 2006).

Die über die Dockingdomänen vermittelte Bindung zwischen den MAPKs und ihren Interaktoren kann sowohl eine reine Bindungsfunktion haben, als auch die Raumstruktur der MAPK beeinflussen (Remenyi et al., 2006). So ändert sich zum Beispiel die Struktur der MAPK Fus3 aus *Saccharomyces cerevisiae* durch die Bindung von Peptiden, die aus verschiedenen D-Motiven von Fus3-interagierenden Proteinen abgeleitet wurden, kaum (Remenyi et al., 2005). Im Gegensatz dazu initiiert die Interaktion eines vom Gerüstprotein Ste5 abgeleiteten Peptids mit der MAPK Fus3 die Formation eines neuen β -Strangs im N-Terminus von Fus3 (Bhattacharyya et al., 2006b).

Die immer wiederkehrende Nutzung derselben Bindungstasche auf der MAPK-Oberfläche durch viele ähnliche Dockingmotive impliziert die Frage, wie auf diese Weise Spezifität in der MAPK-Signalgebung erreicht werden kann. Grundlage für die durch Dockingdomänen vermittelte Spezifität ist offensichtlich ein extrem hohes Maß an Feinabstimmung (Remenyi et al., 2006). In Hefe werden die MAPKs Fus3 und Kss1 durch die MAP2K Ste7 aktiviert, wobei diese spezifische Aktivierung über Dockingdomänen vermittelt wird. Die ebenfalls von Dockingdomänen abhängende Erkennung des Substrates Far1 erfolgt hingegen nur durch die MAPK Fus3 und nicht durch die MAPK Kss1. Diese selektive Erkennung von Bindungspartnern durch Fus3 wird wahrscheinlich durch minimale Unterschiede in der Flexibilität der Kinase im Vergleich zu Kss1 bewirkt (Remenyi et al., 2005). Ferner ermöglichen selektive Andockinteraktionen die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von ERK2 durch die MAP2Ks MEK1 und 2 bzw. verschiedene Phosphatasen. Durch Mutation von einzelnen Aminosäuren der CD-Domäne kann zwar die Bindung von zwei verschiedenen Phosphatasen unterbunden werden, nicht jedoch die effiziente Bindung der MAP2Ks MEK1 und 2 (Tarrega et al., 2005).

In Pflanzen wurde der Einfluss von Dockingdomänen auf die Regulation der Spezifität von MAPK-Kaskaden bisher nur geringfügig untersucht. Einerseits bewirkt die Mutation eines konservierten Dockingmotivs in der MAP2K NtMEK2 aus Tabak, dass die Aktivierung der MAPKs SIPK und WIPK *in vivo* stark reduziert war bzw. aufgehoben wird (Jin et al., 2003). Andererseits führt die Mutation einer putativen CD-Domäne in der MAPK WIPK in Tabak zu einer starken Abschwächung der Aktivierung von WIPK durch die MAP2K NtMEK2 (Liu et al., 2003). Außerdem wird SIPK von der Phosphatase NtMKP1 gebunden und inaktiviert,

wobei die Bindung von SIPK an NtMKP1 die Aktivität der Phosphatase erhöht. Die starke Aktivierung der Phosphatase durch SIPK hängt teilweise von einer putativen CD-Domäne ab (Katou et al., 2005). Zudem konnten im Genom von *Arabidopsis thaliana* 20 (putative) MAPKs identifiziert werden, von denen ein großer Teil im C-Terminus die evolutionär konservierte CD-Domäne enthält (MAPK-Group, 2002).

1.3.1.2 Gerüstproteine als aktive Strukturelemente

Gerüstproteine bewirken die Komplexierung von spezifischen, katalytisch aktiven Elementen mit den ihnen vorgelagerten oder nachgelagerten Partnern (Bhattacharyya et al., 2006a) (Abb. 1.4 A). Die Regulation der MAPK-Module wird in Hefe und Säugern durch Gerüstproteine auf verschiedenen Wegen unterstützt (Elion, 2001; Dard and Peter, 2006).

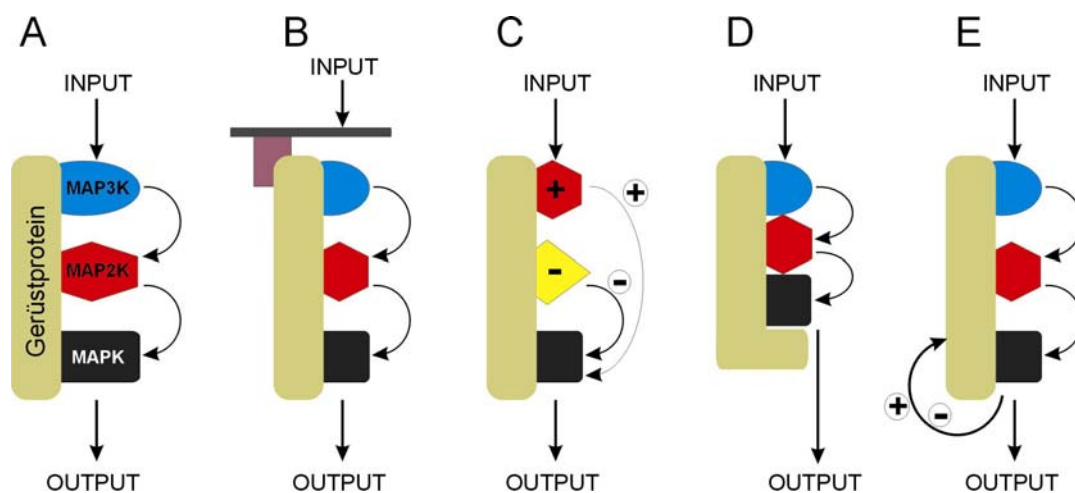


Abb. 1.4 Funktionen von Gerüstproteinen in der MAPK-Signalgebung. **(A)** Durch die Bindung von Kinasen, Substraten oder Regulatoren an Gerüstproteine entstehen Multiproteinkomplexe, welche die Signalgebung in eine bestimmte MAPK-Kaskade kanalisieren. **(B)** Eine über das Gerüstprotein vermittelte Co-Lokalisierung mit vorgelagerten Signalkomponenten kann die Aktivierung der MAPKs räumlich und/oder zeitlich begrenzen. **(C)** Eine vom Gerüstprotein abhängende zeitliche Begrenzung der MAPK-Aktivierung ist möglich, wenn das Gerüstprotein auch eine Phosphatase bindet. **(D)** Durch eine Änderung der Raumstruktur ließe sich eine allosterische Aktivierung der mit dem Gerüstprotein assoziierten Kinasen erreichen. Dies kann die Effizienz der Signalgebung erhöhen. **(E)** Das Gerüstprotein kann gleichzeitig ein Substrat der MAPK sein. Im Anschluss an die Phosphorylierung des Gerüstproteins konnten sowohl positive als auch negative Rückkopplungseffekte beobachtet werden. (Abbildung erstellt in Anlehnung an Bhattacharyya et al. 2006a und Dard und Peter 2006)

Eine über das Gerüstprotein vermittelte Co-Lokalisierung mit vorgelagerten Signalkomponenten oder die Bindung einer Phosphatase kann die Aktivierung der MAPKs räumlich bzw. zeitlich begrenzen (Abbildungen 1.4 B und C). In Säugerzellen erhöht die Phosphorylierung des Rezeptors AT1aR dessen Bindungsaffinität für das multifunktionale Gerüstprotein β -Arrestin 2 (Luttrell et al., 2001). Danach binden die einzelnen Komponenten einer MAPK-Kaskade (cRaf-1, MEK1 und ERK2) an β -Arrestin 2. Die Endozytose dieses Multiproteinkomplexes bewirkt schließlich eine Umverteilung der aktivierten MAPK ERK2 an

endosomale Vesikel (Luttrell et al., 2001) und somit die örtliche Limitierung der MAPK-Aktivität. Eine zeitliche Begrenzung der Aktivität der MAPK JNK in Neuronen von Säugern wird dadurch erreicht, dass zum Beispiel das Gerüstprotein JIP-1 nicht nur die Komponenten der MAPK-Kaskade bindet, sondern auch die Phosphatase MKP7 (Willoughby et al., 2003). Die Bindung der Phosphatase MKP7 resultiert in einer Deaktivierung der MAPK JNK.

Zusätzlich können Gerüstproteine über die Veränderung ihrer Raumstruktur die gebundenen Proteinkinasen neu ausrichten und so die Effizienz der Signalgebung ändern (Abb. 1.4 D). Hinweise darauf lieferten unter anderem Studien mit artifiziellen Gerüstproteinen, deren Effizienz der Signalübertragung geringer war als bei Wildtyp-Gerüstproteinen (Harris et al., 2001; Park et al., 2003). Zudem ändert das Gerüstprotein Ste5 durch Bindung der MAPK Fus3 deren katalytische Aktivität (Bhattacharyya et al., 2006b).

Überdies kann die Aktivierung der MAPK auch zu einer Phosphorylierung des Gerüstproteins und so zu positiver oder negativer Rückkopplung führen (Abb. 1.4 E). Die Fähigkeit der MAPK Fus3, das mit ihr assoziierte Gerüstprotein Ste5 zu phosphorylieren, wurde bereits in mehreren Studien bewiesen (Kranz et al., 1994; Flotho et al., 2004; Bhattacharyya et al., 2006b). Jedoch hat die Phosphorylierung von Ste5 unterschiedliche Konsequenzen. So führt eine Pheromon-induzierte Aktivierung von Fus3 zu einer Hyperphosphorylierung von Ste5, welches an der Plasmamembran lokalisiert ist, und erhöht gleichzeitig die Konzentration von Ste5 an der Plasmamembran (Flotho et al., 2004). Über diese positive Rückkopplung erfolgt wahrscheinlich eine strenge Regulation von Ste5 am Ort des polaren Wachstums, welches durch die Pheromone ausgelöst wird. Die durch Rekrutierung an das Gerüstprotein Ste5 ausgelöste Autophosphorylierung von Fus3 bewirkt hingegen über einen unbekanntenen Mechanismus die negative Kontrolle der Signalübertragung über die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade (Bhattacharyya et al., 2006b).

In Pflanzen konnte bisher kein einziges der in Hefe und Säugern ubiquitär verbreiteten und strukturell sehr diversen Gerüstproteine identifiziert werden. Es gibt lediglich erste Hinweise, dass AtMEKK1 neben ihrer Rolle als MAP3K eine Funktion als Strukturelement besitzt (Ichimura et al., 1998; Nakagami et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). So untergliedert sich AtMEKK1 in eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale Kinasedomäne, welche im Hefe-2-Hybridsystem mit der AtMPK4 bzw. AtMKK1 und 2 interagiert (Ichimura et al., 1998). Des Weiteren ist die flg22-induzierte Aktivierung von AtMPK4 unabhängig von der Kinaseaktivität von AtMEKK1 (Suarez-Rodriguez et al., 2007). Scheinbar kann die Aktivierung der Kaskade um AtMPK4 durch eine andere MAP3K übernommen werden. Für die strukturelle Funktion von AtMEKK1 fehlt allerdings ein Ersatz (Suarez-Rodriguez et al., 2007). Außerdem entspricht AtMEKK1 der MAP3K in *Arabidopsis*

thaliana, die am nächsten mit der MAP3K OMTK1 aus Luzerne verwandt ist (Nakagami et al., 2006). OMTK1 ist eine H₂O₂-responsive MAP3K, welche die Eigenschaften besitzt, über eine direkte Interaktion die ebenfalls H₂O₂-induzierte MAPK MMK3 zu aktivieren (Nakagami et al., 2004). All dies sind Indikatoren dafür, dass OMTK1 bei der Aktivierung von H₂O₂-induziertem Zelltod in Pflanzen eine Rolle als Gerüstprotein übernimmt.

1.3.2 Die Vielfältigkeit der MAPK-Substrate

Proteinkinasen wie MAPKs haben häufig mehrere Substrate (Madhani, 2006). Im folgenden soll dieses Phänomen am Beispiel einer MAPK-Familie aus Säugern erklärt werden. Die MAPK-Familie der *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs), welche ursprünglich als stressaktivierte Proteinkinasen in der Leber von Ratten identifiziert wurden, besteht aus den MAPKs JNK1, 2 und 3 (Bogoyevitch and Kobe, 2006). Mittlerweile wurden über 50 verschiedene Proteine als Substrate von JNKs beschrieben. Dazu gehört einerseits ein breites Spektrum an kern-lokalisierten Proteinen wie die Transkriptionsfaktoren c-Jun und p53 oder der Hormonrezeptor für Androgen (Bogoyevitch and Kobe, 2006). Andererseits zählen auch viele außerhalb des Zellkerns lokalisierte Proteine zu den Substraten der JNK-MAPKs. Durch Phosphorylierung der E3-Ubiquitinligase Itch und von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen beeinflussen JNKs den Proteinabbau bzw. die Bewegungsfähigkeit der Zellen. Das JNK-bindende Gerüstprotein JIP1 ist ebenso Ziel der Aktivität von JNKs wie das mitochondriale Protein Bcl2, welches proapoptotisch wirkt (Bogoyevitch and Kobe, 2006). Die Phosphorylierung der Substrate durch JNKs kann die Aktivität der Substrate sowohl positiv (c-Jun, p53, Itch) als auch negativ (Androgenrezeptor, Bcl2) beeinflussen.

In Pflanzen konnten bisher nur sehr wenige MAPK-Substrate *in vivo* identifiziert werden. Zuerst wurden zwei Isoformen der ACC-Synthase (ACS), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Ethylen-Biosynthese katalysiert, als Substrate von AtMPK6 beschrieben (Liu and Zhang, 2004). Die Phosphorylierung von ACS2 und 6 resultiert in einer Akkumulation von ACS-Protein und damit in einer erhöhten ACS-Aktivität. Später zeigte eine Studie in *Nicotiana tabacum*, dass die Phosphorylierung eines Mikrotubuli-assoziierten Proteins (NtMAP65-1a) durch die MAPK NPK1/NTF6 eine Schlüsselreaktion in der Kontrolle der Zytokinese darstellt (Sasabe et al., 2006). Dabei verursacht die *in vivo* Phosphorylierung von NtMAP65-1a an Position Thr-579 eine Destabilisierung der Organisation der Mikrotubuli. Über Hefe-2-Hybridanalysen gefolgt von *in vitro* Phosphorylierung der putativen Substrate durch die untersuchten MAPKs sowie Mutantanalysen wurden weitere mögliche MAPK-Substrate identifiziert (Cheong et al., 2003; Andreasson et al., 2005; Menke et al., 2005). Zu diesen gehörten die Transkriptionsfaktoren EREBP1 aus *Oryza sativa* und WRKY1 aus

Nicotiana tabacum. OsEREBP1 wird von der *blast- and wounding-activated MAPK* (BWMK1) *in vitro* phosphoryliert, was in einer verstärkten Bindung von OsEREBP1 an ein GCC-Box DNA-Motiv resultiert (Cheong et al., 2003). GCC-Box DNA-Motive befinden sich auch in den Promotoren mehrerer *pathogenesis related genes* (PR-Gene). Auch für WRKY1 aus Tabak konnte *in vitro* eine Phosphorylierung durch eine MAPK namens SIPK gezeigt werden (Menke et al., 2005). Nach der Phosphorylierung zeigt der Transkriptionsfaktor WRKY1 eine verstärkte Bindung an ein als W-Box bezeichnetes DNA-Sequenzmotiv aus einem Promotor eines Chitinase-Gens von Tabak. Ebenso wurde das Protein MKS1 durch Hefe-2-Hybridanalyse als Substrat der MAPK AtMPK4 identifiziert (Andreasson et al., 2005). MKS1 wurde *in vitro* von AtMPK4 phosphoryliert und koppelt *in vivo* die AtMPK4-regulierte Aktivierung von Abwehrreaktionen an WRKY25 und 33 über einen noch unbekanntem Mechanismus.

Demzufolge stehen den mehr als 50 bereits identifizierten MAPK-Substraten einer einzigen MAPK-Familie aus Säugern nur fünf zum Teil *in vivo* bestätigte MAPK-Substrate im gesamten Pflanzenreich gegenüber. Diese Diskrepanz verdeutlicht die dringende Notwendigkeit einer systematischen Suche nach MAPK-assoziierten Proteinen in Pflanzen.

1.4 Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen ist ein hoch komplexes Problem

Protein-Protein-Interaktionen sind für fast alle Aspekte des Lebens essentiell. Um ihre Funktionen erfüllen zu können, interagieren Proteine mit anderen Proteinen aber auch mit Nucleinsäuren und Lipiden. Auch MAPK-Kaskaden und die mit ihnen assoziierten Substrate und Regulatoren sind Teil des eukaryotischen Interaktionsnetzwerkes der Proteine. Die molekulare Basis für die Protein-Protein-Interaktionen der MAPKs bilden dabei unter anderem Andockinteraktionen und Gerüstproteine.

Für Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* wurden bereits Ausschnitte des von Proteinen gebildeten Interaktionsnetzwerkes beschrieben (Uetz et al., 2000; Ito et al., 2001; Li et al., 2004; Gavin et al., 2006). Das wahre Ausmaß der Komplexität von Netzwerken, welche auf Protein-Protein-Interaktionen beruhen, soll im folgenden anhand des Hefe-Proteoms kurz verdeutlicht werden. Basierend auf verschiedenen Experimenten wurde die Zahl möglicher Protein-Protein-Interaktionen je Protein in Hefe auf durchschnittlich fünf geschätzt (Kumar and Snyder, 2002). Angenommen, jedes der in der Yeast Protein Database (YPD; <http://www.biobase-international.com/pages/index.php?id=YPD>; 20.02.2007) erfassten 6636 Proteine interagiert mit fünf Proteinen, so würde das Hefe-Proteom mehr als 30.000 Protein-Protein-Interaktionen umfassen.

Im Vergleich zur Situation in Hefe und tierischen Modellsystemen schreitet die Kartierung von Proteininteraktionen in Pflanzen nur langsam voran (Uhrig, 2006). Bekannt ist allerdings, dass das Genom von *Arabidopsis thaliana* etwa viermal mehr Gene enthält als das Genom von Hefe (Goffeau et al., 1996; The_Arabidopsis_Genome_Intiative, 2000). Infolgedessen liegt wahrscheinlich auch die Zahl der in *Arabidopsis thaliana* stattfindenden Protein-Protein-Interaktionen weit über der in Hefe stattfindenden Protein-Protein-Interaktionen. Diese Schätzungen weisen auf das Vorliegen eines sehr komplexen Problems hin.

Zusätzlich erschwert wird die Analyse der Wechselwirkungen durch die sehr verschiedenen physikochemischen Eigenschaften von Proteinen. Gleichzeitig unterscheidet sich auch noch die Abundanz der einzelnen in einer Zelle vorliegenden Proteine um mehrere Größenordnungen (Piehler, 2005).

Weiterhin ist die Identifikation von regulatorisch wirkenden MAPK-Interaktoren wie Gerüstproteinen auf der Grundlage von Sequenzhomologien zwischen Proteinen aus Tieren und Hefe einerseits und Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* andererseits nicht möglich. Die Mechanismen zur Erzeugung spezifischer Signaltransduktion durch MAPKs in Pflanzen bzw. Tieren und Hefe werden sich jedoch nicht vollständig voneinander unterscheiden. Vielmehr existieren in Pflanzen sehr wahrscheinlich Proteine, die analog zu den Gerüstproteinen etc. funktionieren. Funktionelle Analogie setzt jedoch keine Homologie auf Sequenzebene voraus. Mit dem wachsenden Interesse an der Offenlegung von Protein-Protein-Interaktionen und der funktionellen Charakterisierung von Proteinen in der Zelle kam es zur Entwicklung bzw. Optimierung verschiedener für die Interaktionsanalyse geeigneter Technologien (Zhu and Snyder, 2002; Piehler, 2005; Elion, 2006). Daher sollten vor Beginn einer Studie über Protein-Protein-Interaktionen die Methoden ausgewählt werden, die für die jeweilige konkrete Zielsetzung geeignet sind. Mit Blick auf die Identifizierung von MAPK-interagierenden Proteinen bietet sich der Einsatz von Technologien wie Hefe-2-Hybridanalyse, Protein-Array und Affinitätschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie an. Eine für proteomische Untersuchungen optimierte Variante der Affinitätschromatographie ist die Tandemaffinitätsreinigung (*tandem affinity purification*; TAP) nach Rigaut et al. (1999).

Jede dieser Techniken hat Vorteile, aber auch Nachteile (Tabelle 1.1). Daher wird kein einziger der mit diesen Methoden erhaltenen Datensätze zu endgültigen Aussagen über Protein-Protein-Interaktionen führen können (Zhu and Snyder, 2002; Piehler, 2005). Ein Ausschluss von falsch positiven bzw. falsch negativen Resultaten wird nur durch Integration der unterschiedlichen Datensets oder Verifizierung von Daten mit Hilfe von anderen Methoden möglich sein.

Tab. 1.1 Methoden der Proteomik zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von MAPKs.

Methoden	Vorteile	Nachteile
Hefe-2-Hybridanalyse	schneller, direkter Ansatz zur Offenlegung neuer Interaktionen	heterologes System, binäre Interaktionen zwischen Proteinen üblicherweise im Zellkern
Protein-Array	Identifizierung von nachgelagerten Zielproteinen auf Proteomebene	reiner <i>in vitro</i> Ansatz
Affinitätschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	proteomweite Suche nach Multiproteinkomplexen, an deren Aufbau das markierte Köderprotein beteiligt ist	transiente oder schwache Interaktionen sowie nicht abundante Proteine werden zum Teil nicht erfasst

1.5 Zielsetzung

Im Gegensatz zu Hefe und Säugern konnten in *Arabidopsis thaliana* bisher nur wenige MAPK-Kaskaden vollständig offengelegt werden (Asai et al., 2002; Teige et al., 2004; Meszaros et al., 2006; Wang et al., 2007). Außerdem kennt man im Pflanzenreich bis jetzt nur wenige Substrate von MAPKs (Cheong et al., 2003; Liu and Zhang, 2004; Sasabe et al., 2006). Auch die Regulatoren von MAPK-Modulen wie Gerüstproteine oder Phosphatasen sind in Pflanzen bis jetzt nahezu unbekannt. Aus diesen Gründen sind systematische genetische Analysen, Expressionsstudien und Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen in *Arabidopsis thaliana* und anderen Modellpflanzen unabdingbar. Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung und Identifizierung von Proteinen, die mit der MAPK MPK3 aus *Arabidopsis thaliana* (AtMPK3) interagieren.

Prinzipiell kann der Nachweis von MAPK-assoziierten Proteinen durch so verschiedene Methoden wie Hefe-2-Hybridanalyse, Protein-Array und Affinitätschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie erfolgen. Da die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen ein komplexes Problem darstellt, wird die Vernetzung von Datensätzen aller dieser Analysen empfohlen (Zhu and Snyder, 2002; Piehler, 2005). Eine genomweite Hefe-2-Hybridanalyse mit AtMPK3 als Köderprotein wurde parallel zu dieser Arbeit in Kooperation mit J. Uhrig durchgeführt (Daten unveröffentlicht). Außerdem konnten im Rahmen einer weiteren Kooperation der Arbeitsgruppe um Prof. D. Scheel mit Hilfe eines im großen Maßstab durchgeführten Protein-Arrays bereits potentielle Substrate von AtMPK3 identifiziert werden (Feilner et al., 2005). Die vorliegende Arbeit sollte die Daten für die Affinitätschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie liefern.

Dazu wurden im Vorfeld zuerst die Möglichkeiten für einen immunologischen Nachweis von AtMPK3 sowie anderer MAPKs aus *Arabidopsis thaliana* geschaffen. Vor der Etablierung der Affinitätsreinigung von AtMPK3 galt es zudem Hinweise über die Anwesenheit von AtMPK3

in Proteinkomplexen zu erbringen. Die Affinitätschromatographie erfolgte anschließend als Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3 nach Rigaut et al. (1999) und sollte sowohl bezüglich der Probenvorbereitung als auch bezüglich der Reinigung des Köderproteins AtMPK3 optimiert werden. In einem letzten Schritt wurden die durch die Aufreinigung von AtMPK3 erhaltenen Proteingemische analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

In der Regel wurden die verwendeten Chemikalien von Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (München, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) geliefert.

Die im folgenden aufgeführten speziellen Chemikalien wurden von den angegebenen Lieferanten bezogen: 2,2'-Dithiobis(succinimidyl-propionat) (DSP) von Pierce (IL, USA), das Surfactant Silwet L-77 von Lehle Seeds (TX, USA) sowie [γ - 32 P]ATP IsobluTM mit einer spezifischen Aktivität von >4000 Ci/mmol bzw. >148 TBq/mmol von ICN (CA, USA).

Peptide für die Elizitierung von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen und Pflanzen sowie die Gewinnung von Peptidantikörpern wurden von einem laborinternen Service mittels Festphasensynthese in einem „Economy Peptide Synthesizer EPS 221“ (ABIMED, Langenfeld, Deutschland) synthetisiert.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten lieferten Promega (Mannheim, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) und Eurogentec (Seraing, Belgien). Der Verdau von Proteinen für die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch rekombinant exprimiertes Trypsin (Proteomics grade, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland).

2.1.2 Pflanzen

Das vegetative Wachstum der *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen erfolgte unter Kurztagsbedingungen (8h Licht/ 16h Dunkelheit) in klimatisierten Anzuchtschränken bzw. Phytokammern. Bei Licht betrug die Temperatur 23°C und bei Dunkelheit 21°C. Im Durchschnitt betrug die relative Luftfeuchte 60% und die Lichtstärke circa 150 μ Mol/m²s.

Für die Samenbildung wurden die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen im klimatisierten Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16h Licht/ 8h Dunkelheit) kultiviert. Im Mittel betrug die Temperatur im Gewächshaus 22°C und die relative Luftfeuchte 63%. In Abhängigkeit von der Außenbelichtung wurde die Schattierung bzw. Beleuchtung zugeschaltet.

Für die Arbeiten wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Pflanzen verwendet, wobei die Anzucht stets in einem Kultursubstrat bestehend aus 60% Einheitserde GS90 und 40% Vermiculit erfolgte.

Tab. 2.1 Verwendete Pflanzen.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)		
At pTA7002 At pTANLP _{ps}	<i>A. thaliana</i> (Col-0) transformiert mit: pTA7002-Vektor pTA7002-Plasmid mit einem Insert, das für NLP _{ps} kodiert	S. Kamoun (Ohio State University, OH, USA)
At <i>mpk3</i>	Mutante, die durch Bestrahlung von <i>A. thaliana</i> (Col-0) mit γ -Strahlen erzeugt wurde	B. Ellis (University of British Columbia, Vancouver, Kanada)
At <i>mpk4</i>	Mutante, die aus <i>Ds</i> -Transposon-Mutagenese von <i>A. thaliana</i> (Ler) hervorging	J. Mundy, (Petersen et al., 2000)
At <i>mpk6</i>	SALK-Linie 127507, <i>A. thaliana</i> (Col-0)	Salk Institute Genome Analysis Laboratory (CA, USA)
35S::TAP Linien #9 und 10	Expression der TAP-Markierung nach Rigaut et al. (1999) unter dem 35S-Promotor, <i>A. thaliana</i> (Col-0)	(Spielau, 2004)
AtMPK3-TAP Linien #6 und 8	Expression der C-terminal mit TAP-markierten AtMPK3 unter endogenem Promotor, <i>A. thaliana</i> (Col-0)	C. Spielau (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Deutschland)
35S AtMPK3-TAP Linie #5	Expression der C-terminal mit TAP-markierten AtMPK3 unter 35S-Promotor, <i>A. thaliana</i> (Col-0)	C. Spielau (s.o.)
35S AtTGA2-TAP	Expression des C-terminal mit TAP-markierten AtTGA2 unter 35S-Promotor, <i>A. thaliana</i> (Col-0)	R. Weigel (BASF Plant Science, Limburgerhof, Deutschland)

2.1.3 Zellsuspensionskulturen

Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* (Col-0) und (Ler) wurden in mit Gamborg B5 Vitaminen versetztem Murashige und Skoog (MS-) Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande) (pH 5,7) unter Zugabe von 1 mg/l 2,4 D und 30 g/l Saccharose kultiviert. Die Zellkulturen wurden in Kolben mit je 40 ml Medium im Dunkeln bei 25°C geschüttelt (120 U/min) und einmal wöchentlich in frisches Medium überführt.

2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide

Die Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7,0) bei 37°C. Platten enthielten zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar. Die Medienzutaten lieferten die Otto Nordwald GmbH (Hamburg, Deutschland) und die Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland).

Die verwendeten Bakterienstämme (Tabelle 2.2) wurden für die Experimente mit verschiedenen Plasmiden (Tabelle 2.4) transformiert. Im Anschluss daran wurde mit Hilfe von

100 mg/l Ampicillin (Sigma, München, Deutschland) auf die Antibiotikaresistenz hin selektiert.

Die *E. coli*-Stämme wurden generell als 7% (v/v) Dimethylsulfoxid-Stammproben bei -80°C gelagert.

Tab. 2.2 Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	Bethesda Research Laboratories (MD, USA)
TOP10F'	F'[<i>lacI^q</i> , <i>Tn10</i> (<i>Tet^R</i>)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
SURE® cells	<i>e14-</i> (<i>McrA-</i>) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (<i>Kan^r</i>) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10</i> (<i>Tet^r</i>)]	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
BL21	F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB-</i> <i>mB-</i>), <i>gal</i>	Invitrogen, (Groningen, Niederlande)

Tab. 2.3 Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCR®2.1-TOPO®	<i>Plac</i> ; <i>lacZ</i> α ; <i>f1 ori</i> ; <i>Kan^r</i> ; <i>Amp^r</i> ; <i>pUC ori</i>	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pGEX4T-1	<i>Ptac</i> ; Glutathione S-transferase; β -Lactamase; <i>Amp^r</i> ; <i>pBR322 ori</i> ; <i>lacI^q</i>	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

Tab. 2.4 Verwendete Plasmide mit Insert.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGEX-M3 pGEX-M4	pGEX4T-1-Derivat mit <i>AtMPK3</i> - bzw. <i>AtMPK4</i> -cDNA, der am 5'-Ende eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine <i>Xho</i> I-Schnittstelle angefügt wurde	diese Arbeit
pGEX-M6	pGEX4T-1-Derivat mit <i>AtMPK6</i> -cDNA, der am 5'-Ende eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine <i>Not</i> I-Schnittstelle angefügt wurde	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Tab. 2.5) wurden von der Firma MWG Biotech (Martinsried, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.5 Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz
AtMPK3-BamHI.fwd	5'-AAGGATCCATGAACACCGGCGGTGGCC-3'
AtMPK3-XhoI.rev	5'-AACTCGAGCTAACCGTATGTTGGATTGAGTGC-3'
AtMPK4-BamHI.fwd	5'-AAGGATCCATGTCGGCGGAGAGTTGTTTCG-3'
AtMPK4-XhoI.rev	5'-AACTCGAGTCACACTGAGTCTTGAGGATTGAAC-3'
AtMPK6-BamHI.fwd	5'-AAGGATCCATGGACGGTGGTTCAGGTCAACC-3'
AtMPK6-NotI.rev	5'-AAGCGGCCGCCTATTGCTGATATTCTGGATTGAAAGC-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung von Pflanzenmaterial

2.2.1.1 Elizitorbehandlung von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen

Vor der Elizitierung wurden fünf Tage alte Zellen durch Filtration geerntet und mit MS-Medium gewaschen. Nach dem Resuspendieren der Zellen in MS-Medium (100 g Zellen/l) folgte die Äquibrierung bei Dunkelheit unter konstantem Schütteln für zwei bis drei Stunden. Die Elizitorbehandlung erfolgte durch Zugabe einer wässrigen Stammlösung des Elizitors flg22 (Endkonzentration 100 nM, Sequenz QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA). Nach 10 Minuten wurden die Zellen durch Filtration geerntet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.2.1.2 Elizitorbehandlung von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mittels Infiltration

Für die Elizitierungsexperimente mit dem Peptid flg22 wurden fünf bis sechs Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Die Infiltration einer 10 µM wässrigen flg22-Lösung erfolgte mittels einer kanülenlosen Einwegspritze in die Unterseite der Rosettenblätter. Nach 20 Minuten wurden die infiltrierten Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Da die Infiltration zu Verwundungen führt und in einer Aktivierung von MAPKs resultiert, wurden als Kontrolle Blätter mit Wasser behandelt.

2.2.1.3 Transiente Expression von NLP aus *Phytophthora sojae* (NLP_{Ps}) in *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Zur Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mittels transienter Expression von NLP_{Ps} wurden transgene Pflanzenlinien verwendet, in denen ein binäres Konstrukt stabil in die chromosomale DNA integriert war. Bei dem einen Konstrukt handelte es sich um den binären Vektor pTA7002 ohne Insert, wobei diese Linie als Kontrolle diente. Bei dem anderen Konstrukt

enthält der Vektor zusätzlich die Sequenz des nicht wirtsspezifischen Toxins NLP_{Ps}. Die Verwendung dieses Konstrukts ermöglicht eine Expression von NLP_{Ps} *in planta* im Anschluss an eine Behandlung mit Dexamethason (DEX).

Die DEX-Behandlung von 4 Wochen alten Pflanzen erfolgte durch Besprühen mit einer Lösung aus 20 µM DEX und 0,05% (v/v) Silwet. Silwet erleichtert das Eindringen von DEX in die Pflanzenzelle. Nach sechs Stunden wurden alle oberirdischen Pflanzenteile geerntet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.2.1.4 Applikation von Substanzen zur chemischen Vernetzung von Proteinen in Blättern von *Arabidopsis thaliana*

Durch chemische Vernetzung (*crosslinking*) können instabile Proteinkomplexe gefestigt werden. Die Applikation (*in vivo*) der membranpermeablen *crosslinker* Formaldehyd (HCHO) und 2,2'-Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) erfolgte durch Vakuuminfiltration, Flottieren von Rosettenblättern bzw. Besprühen aller oberirdischen Pflanzenteilen *in vivo* appliziert. Als Kontrollen kamen für HCHO eine 1x PBS-Lösung (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,3) bzw. Wasser und für DSP eine 8% DMSO-Lösung in 1x PBS bzw. Wasser zum Einsatz.

Die Vakuuminfiltration einer 1%igen (v/v) HCHO-Lösung bzw. einer 2,5 mM DSP-Lösung erfolgte nach dem Protokoll von Rohila et al. (2004). Isolierte Blätter wurden zunächst für 30 min bei 4°C mit dem in 1x PBS gelösten *crosslinker* unter Vakuum infiltriert. Nach dem Abstoppen der Reaktionen zur chemischen Vernetzung von Proteinen durch Zugabe von 300 mM Glyzin für 30 min wurde das Blattmaterial in 1x PBS gewaschen.

Zur Applikation der *crosslinker* mittels Flottieren wurden isolierte Rosettenblätter in eine 1%ige (v/v) HCHO-Lösung bzw. eine 2,5 mM DSP-Lösung gelegt und unter leichtem Schütteln (50 U/min) für 1 und 2 h inkubiert. Da die Applikation von DSP im Gegensatz zu HCHO nicht letal wirkte, war zusätzlich eine 4 h andauernde Inkubation mit DSP möglich.

Parallel zu diesen Versuchen wurden Pflanzen mit einer 1%igen (v/v) HCHO-Lösung bzw. einer 5 mM DSP-Lösung besprüht. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte hier ebenfalls für Formaldehyd nach 1 bzw. 2 h sowie für DSP nach 1, 2 bzw. 4 h.

Alle mit *crosslinker* behandelten Pflanzenteile wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C tiefgefroren.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmiden

Die Plasmidpräparation erfolgte durch alkalische Lyse eines geringen Kulturvolumens (Sambrook et al., 1989). Zu diesem Zweck wurde das „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) benutzt. Die Präparation erfolgte nach Herstellerprotokoll.

2.2.2.2 Fällung von DNA

Durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) kann DNA gefällt werden. Nach einer Zentrifugation bei 23.000 x g für 20 min wurde das Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA in sterilem Wasser oder in 10 mM TrisHCl (pH 8,0) aufgenommen.

2.2.2.3 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Dazu wurde als Laufpuffer 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA) und als Separationsmatrix 1%ige (w/v) SeaKem® LE Agarose (Cambrex Bio Science, ME, USA) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10x DNA-Probenpuffer (10 mM EDTA; 30% (v/v) Glycerin; 0,1% Bromphenolblau) versetzt. Als DNA-Größenstandard diente entweder der „Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ oder der „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Da die Gele Ethidiumbromid (3 µl in 30 ml 1% Agaroselösung) enthielten, konnten die Banden unter UV-Licht mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes sichtbar gemacht werden.

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) nach Herstellerangaben aus Agarosegelen isoliert.

2.2.2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*; Saiki et al., 1985) ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Abschnitten, die von zwei definierten DNA-Sequenzen begrenzt werden. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit Heizdeckel (GeneAmp PCR System 2400 und 9700, Perkin Elmer, MA, USA) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente mittels *Touchdown*-PCR amplifiziert, der folgendes Programm zugrunde lag:

Tab. 2.6 Verwendetes PCR-Programm.

Temperatur	Zeit	
95°C	1 min	
95°C	30 s	} 10x
X°C + 10°C (pro Zyklus um 1°C erniedrigt)	30 s	
72°C	1 min/kb für Taq-Polymerase	
	2 min/kb für Pfu-Polymerase	
95°C	15 s	} 25x
X°C (konstant)	30 s	
72°C	siehe oben	
72°C	7 min	
12°C	unendlich	

(X°C = Primer-spezifische Hybridisierungstemperatur)

Im Allgemeinen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: bis zu 100 ng Matrizen-DNA; 1x Reaktionspuffer (pH 8,3); 200 µM Desoxyribonukleotide (dNTPs); je 20 ng Oligonukleotide und 1 U *Taq*-Polymerase in 20 µl Gesamtvolumen. Bei Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde statt einer Unit *Taq*-Polymerase eine Unit *Pfu*-Polymerase eingesetzt.

Für die Suche nach positiven Klonen mit Hilfe von Kolonie-PCR wurden die *E.coli*-Zellen direkt in die PCR eingesetzt. Deshalb wurde der erste Denaturierungsschritt von einer auf fünf Minuten verlängert. Dadurch werden die Zellen besser aufgeschlossen und die DNA wird so für die Oligonukleotide zugänglich gemacht. Im weiteren Verlauf war die Kolonie-PCR identisch mit dem oben aufgeführten PCR-Programm.

2.2.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Plasmid-DNA und die DNA, welche das zu klonierende Fragment enthielt, wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Für die Ligation wurden Vektor und aus Agarosegelen isoliertes Insert in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer über Nacht bei 4°C oder 16°C. Danach wurde die T4-DNA-Ligase 10 min bei 65°C inaktiviert.

Die nach der chemischen Transformation in DH5α- oder TOP10F'-Zellen erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR getestet. Die Plasmid-DNA von positiven Klonen wurde anschließend präpariert, zur nochmaligen Kontrolle mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

PCR-amplifizierte Fragmente wurden zunächst in den Vektor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert. Die Klonierungen erfolgten nach Herstellerprotokoll. Im Anschluss an die Sequenzierung wurden Fragmente mit der korrekten DNA-Sequenz mit

Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor ausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgereinigt und in den Zielvektor pGEX4T-1 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) kloniert.

2.2.2.6 Transfer von DNA in *E.coli*

Ein 100 µl Aliquot der zu transformierenden chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen wurden mit 1 bis 5 µl Plasmid-DNA gemischt und anschließend 5 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hizeschock bei 42°C für 1 min wurden die Zellen auf Eis gekühlt, mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten.

2.2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice der Firma MWG-Biotech (Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte die Analyse der erhaltenen Sequenzen mit Hilfe von Programmen, die den BLAST-Algorithmus verwenden.

2.2.3 Expression und Aufreinigung von Proteinen mit GST-Fusion

Für die bakterielle Expression von AtMPK3, 4 und 6 wurde der Vektor pGEX4T-1 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet, der stromaufwärts von der *multiple cloning site* die Sequenz der Glutathion-S-transferase (GST) enthält. Daher sind die Expressionsprodukte am N-Terminus mit GST fusioniert und lassen sich durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose-4B (GE Healthcare) aufreinigen.

Zur Proteinexpression wurden Übernachtskulturen der Bakterien auf eine OD₆₀₀ von 0,6 mit frischem LB-Medium verdünnt und nach einer Stunde Schütteln bei 37°C mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; Endkonzentration 0,9 mM) versetzt. Durch Zugabe von IPTG wird die Synthese des Fusionsproteins induziert. Nach weiterem Schütteln für 3 bis 5 h bei 30°C bzw. 37°C wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 5000 x g) geerntet. Nach dem Resuspendieren der Zellen in eiskaltem 1x PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,3) und der Zugabe von 1% Triton X-100 wurden die Zellen durch Ultraschall (3x 10 bis 15 s) lysiert. Daraufhin folgte die Abtrennung der Zellfragmente mittels Zentrifugation (10 min, 4°C, 23.000 x g) und die Zugabe von Glutathion-Sepharose-4B (50% v/v). Dieses Gemisch wurde vorsichtig für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dreimal mit 1x PBS (plus 1 mM PMSF) gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Sepharose durch Zentrifugation (2 min, 4°C, 400 x g) sedimentiert. Durch eine fünfminütige Inkubation der Sepharose in Elutionspuffer (50 mM TrisHCl; 10 mM GSH; pH 8,0) wurde das rekombinante Protein anschließend eluiert.

2.2.4 Antikörperproduktion

2.2.4.1 Gewinnung der Antiseren

Da sich die *Arabidopsis thaliana* MAPKs bezüglich der Aminosäuresequenz hauptsächlich am N- und C-Terminus unterscheiden, wurden für die Gewinnung der Antiseren durch Eurogentec (Seraing, Belgien) Peptide der N-Termini der AtMPK 3, 4 und 6 (3NT, 4NT und 6NT) verwendet. Die Sequenzen der für die Antikörperproduktion verwendeten Peptide lauteten wie folgt:

3NT MNTGGGQYTDFFAVETHGGQ,
4NT MSAESCFGSSGDQSSSKGV,
6NT MDGGSGQPAADTEMTEAPGG.

Vor der Immunisierung von je zwei Kaninchen pro Peptid wurden die Peptide an den Träger KLH (*key limpet hemocyanin*) gekoppelt. Eine Mischung aus Antigen- und Adjuvantlösung wurde insgesamt viermal intradermal injiziert. Blut wurde vor der Immunisierung (Präimmunsrum) sowie 38, 66 und 87 Tage nach der ersten Injektion entnommen.

2.2.4.2 Reinigung der Antiseren

Aus den mit den rohen Antiseren erzielten Ergebnissen wurde ersichtlich, dass die Gewinnung monospezifischer Antiseren gegen die MAPKs 3, 4 und 6 eine Affinitätsreinigung der Rohseren erforderte. Für die Affinitätsreinigung im kleinen Maßstab wurde das „EZ™ Antibody Production and Purification Kit, Sulfhydryl Reactive“ von Pierce (IL, USA) verwendet. Dazu wurden die Peptide 3NT, 4NT und 6NT über eine freie SH-Gruppe (Cystein) an jeweils eine SulfoLink® Column gebunden. Anschließend wurden die Rohseren an den entsprechenden immobilisierten Oligopeptiden affinitätsgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Auf diese Weise verbesserte sich die Spezifität der Antiseren erheblich und es folgte die Affinitätsaufreinigung im großen Maßstab durch Eurogentec (Seraing, Belgien).

2.2.5 Proteinanalytische Methoden

2.2.5.1 Proteinextraktion aus Zellkultur- und Blattmaterial

Für Immunoblot-Analysen und Kinaseaktivitätstests wurden gefrorene Zellen oder gefrorene und gemörserte Blätter mit Kinaseextraktionspuffer (Tabelle 2.7) versetzt und mit Hilfe eines Homogenisators (Heidolph RZR 2020, Schwabach, Deutschland) aufgeschlossen. Nach einer 15minütigen Zentrifugation (23.000 x g, 4°C) wurde der Rohextrakt abgenommen und direkt verwendet oder bei -80°C eingefroren. Für die Immunodetektion von Proteinen mit dem Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper wurden die Proben stets direkt weiterverarbeitet.

Die Aufbereitung von Probenmaterial, welches für die Ausschlusschromatographie verwendet wurde, erfolgte in einem Extraktionspuffer ohne Zusatz von Detergenzien. Gefrorenes und gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit einem Volumen des Laufpuffers (siehe 2.2.5.4) unter Zugabe von EDTA-freien Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), 1mM PMSF, 1 mM DTT, 1mM NaF und 0,5 mM Na₃VO₄ versetzt. Nach dem Auftauen auf Eis und der Zentrifugation bei 23.000 x g für 15 min wurde der Überstand abgenommen und filtriert (Rotilabo®-Spritzenfilter 0,22µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Tab. 2.7 Zusammensetzung des Kinaseextraktionspuffers.

	Bestandteil	Konzentration
	TrisHCl (pH 7,8) NaCl EGTA MgCl ₂ Tween 20	25 mM 75 mM 15 mM 10 mM 0,1% (v/v)
Protease-Inhibitoren	PMSF Leupeptin Aprotinin	0,5 mM 10 µg/µl 10 µg/µl
Phosphatase-Inhibitoren	Glyzerophosphat 4-Nitrophenylphosphatbis[Tris] NaF Na ₃ VO ₄	15 mM 15 mM 1 mM 0,5 mM
genereller Inhibitor	DTT	1 mM

Vor der Tandemaffinitätsreinigung wurde das Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit zwei Volumen TAP-Extraktionspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) NP 40; 1x Roche Proteaseinhibitor-Tabletten EDTA-frei; 1mM PMSF; 1 mM NaF; 0,5 mM Na₃VO₄) versetzt und bei 4°C aufgetaut. Als nächstes folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g sowie eine Zentrifugation für 10 min bei 38.000 x g bei jeweils 4°C. Noch im Überstand verbliebene Partikel wurden anschließend durch Filtration über eine Lage Miracloth (Calbiochem, CA, USA) abgetrennt.

2.2.5.2 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Um die Konzentration von Proteinen in Lösungen zu erhöhen, wurden verschiedene Techniken angewandt. Einerseits wurde die zu konzentrierende Proteinlösung in Centricon® bzw. Microcon® Zentrifugal-Filtereinheiten (Millipore, MA, USA) dem Herstellerprotokoll folgend zentrifugiert. Andererseits wurden Proteinlösungen mit „StrataClean™ resin“ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben behandelt. Dabei wurden die Proteine an ein auf Silica basierendes Granulat gebunden, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in SDS-PAGE Probenpuffer für 3 min bei 95°C denaturiert. Anschließend konnte die Probe mittels eines SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Des Weiteren wurden stark verdünnte Proteinlösungen mit zehn Volumen 10% (w/v) TCA in Aceton (gelagert bei -20°C) gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die so gefällten Proteine wurden für 10 min bei $15.000 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet für mindestens 10 min bei -20°C gewaschen. Nach der Wiederholung der Zentrifugation und der Abnahme des Überstandes folgte das Trocknen des Pellets an der Luft.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines Fertigreagens von Bio-Rad (München, Deutschland). Als Standard zur Erstellung der Eichgeraden diente Rinderserumalbumin.

2.2.5.4 Ausschlusschromatographie

Die Ausschlusschromatographie wurde an einem ÄKTA™ explorer FPLC-System mit Hilfe einer vorgepackten, auf 4°C gekühlten HiLoad16/60-Superdex200 Prepgrade-Säule (alles GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Bei dem Säulenmaterial handelte es sich um ein Verbundmaterial aus hochvernetzter Agarose, an welche Dextran kovalent gebunden war. Die porösen Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von $34 \mu\text{m}$ ermöglichen eine Auftrennung von globulären Proteinen im Bereich von 10 bis 600 kDa. Zur Kalibrierung diente ein „Molecular Weight Marker Kit“ für die Gelfiltrationschromatographie von Sigma (Steinheim, Deutschland), das einen Molekulargewichtsbereich von 29 bis 700 kDa abdeckt.

Anfangs wurde das Trennmaterial mit mindestens zwei Volumen Laufpuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin) bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die Applikation von 1 ml der Probe mit einer Gesamtproteinkonzentration von 2,5 bis 3 mg/ml erfolgte automatisch über eine Injektionsschleife. Während der Elution der Proteine mit einer Flussrate von 1 ml/min wurde kontinuierlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Nach dem Durchlauf des Ausschlussvolumens begann die Fraktionierung des Eluats (1,5 ml Fraktionen) mit Hilfe des Fraktionssammlers Frac-950 (GE Healthcare).

2.2.5.5 Tandemaffinitätsreinigung

Die für die Tandemaffinitätsreinigung nach Rigaut et al. (1999) präparierten Totalextrakte wurden auf eine Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt und bei konstant 4°C wie folgt aufgereinigt. Nach Zugabe von $20 \mu\text{l}$ äquilibrierter IgG-Sepharose™ 6 FastFlow (50% v/v, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) je Milliliter Proteinextrakt inkubierte die Extrakt-Sepharose-Mischung für 2 h auf einem Rotator. Anschließend erfolgte die

Überführung des Gemisches in leere Poly-Prep® Chromatographiesäulen (Bio-Rad, München, Deutschland). Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 20 Bettvolumen Waschpuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) NP 40; 1 mM PMSF; 1 mM NaF) entfernt. Danach musste die IgG-Sepharose mit 10 Bettvolumen TEV-Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) NP 40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) äquilibriert werden. Die Abspaltung der gebundenen Proteine erfolgte nach Zugabe von drei Volumen TEV-Puffer und 7,5 U AcTEV™-Protease (Invitrogen, Groningen, Niederlande) pro 5 mg Gesamtprotein. Im Anschluss an die 90 min währende Inkubation auf einem Rotator wurden die abgespaltenen Proteine mit Hilfe von Poly-Prep® Chromatographiesäulen mit 3 Volumen CB-Puffer (50 mM TrisHCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 10% (v/v) Glycerin; 10 mM β-Mercaptoethanol) eluiert. Nach dem Einstellen der Kalzium-Konzentration im Eluat auf 2 mM folgte die Beimischung von 10 µl äquilibrierter Calmodulin Agarose (50% v/v, Stratagene, Heidelberg, Deutschland) je Milliliter des ursprünglich eingesetzten Totalextraktes. Während der sich anschließenden zweistündigen Inkubation auf einem Rotator wurden die Proteine gebunden. Vor der Elution der Proteine durch Zugabe von 3 Bettvolumen CE-Puffer (50 mM TrisHCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 0,02% (v/v) NP 40; 20 mM EGTA; 10 mM β-Mercaptoethanol) wurde die Calmodulin-Agarose mit 20 Bettvolumen CB-Puffer gewaschen. Da beim letzten Schritt eine möglichst vollständige Elution der gebundenen Proteine erreicht werden sollte, wurde die Elution für 30 min bei 15°C ausgeführt.

Infolge der im Ergebnisteil dieser Arbeit näher beschriebenen experimentellen Probleme kam im Verlauf dieser Arbeit auch eine abgewandelte Variante der Tandemaffinitätsreinigung zum Einsatz, bei der die Reinigung nach der Bindung an die IgG-Sepharose unterbrochen wurde. Nach dem Waschen der IgG-Sepharose mit 30 Bettvolumen Waschpuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) NP 40; 1 mM PMSF; 1 mM NaF) wurden gebundene Proteine durch Zugabe von viermal einem Bettvolumen 100 mM Glyzin pH 3,0 eluiert. Mittels 1 M TrisHCl pH 9,0 erfolgte umgehend die Neutralisierung der einzelnen Fraktionen.

2.2.5.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.2.5.6.1 Eindimensionale, denaturierende PAGE

Bei dieser Art der Auftrennung von Proteinen kamen zwei verschiedene Gelsysteme zum Einsatz. In der Regel wurden SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) mit einer gleichbleibenden Acrylamid-Konzentration von 6, 10, 12 oder 15% verwendet. Zur optimalen Auftrennung von

Proteinen mit sehr unterschiedlichen Molekulargewichten wurden hingegen Gradientengele (5 bis 12,5%) eingesetzt. Die Herstellung der Gele erfolgte mittels konzentrierter Acrylamid-lösung Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines Gradientenformers (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Zusammensetzung der Gelmatrix basierte auf Protokollen von Sambrook et al. (1989).

Vor dem Beladen der Gele wurden die Proteinextrakte mit Probenpuffer (Endkonzentration: 50 mM TrisHCl pH 6,8; 1% (v/v) β -Mercaptoethanol bzw. 100 mM DTT; 2% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 10% (v/v) Glycerin) versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Proteintrennung wurde in Minigel- oder Maxigelapparaturen der Firma Hoefer (CA, USA) im Laufpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glyzin; 0,1% (v/v) SDS) bei 80 – 200 V durchgeführt. Als Protein-Molekulargewichtsmarker diente der „Precision Plus Protein Standard“ von Bio-Rad (München, Deutschland). Anschließend wurden die Gele für Immunoblotanalysen verwendet, mit Coomassie oder Silber gefärbt oder autoradiographisch analysiert.

2.2.5.6.2 Eindimensionale, native PAGE

Ein direkter Ansatz zur Durchführung von nativer PAGE ist, während der Extraktion und Auftrennung der Proteine jeglichen Kontakt mit Detergenzien sowie reduzierenden Agenzien auszuschließen und die Proben nicht zu erhitzen. Daher unterschieden sich die hier verwendeten nativen Gradientengele (5 bis 10%) und die Vorbereitung der nativ aufzutrennenden Proben nur unter diesen Gesichtspunkten von der unter 2.2.5.6.1 beschriebenen SDS-PAGE.

2.2.5.6.3 Zweidimensionale, denaturierende PAGE

Zweidimensionale, denaturierende PAGE erfolgte im Rahmen dieser Arbeit im Minigel-Maßstab unter Einsatz von 7 cm langen IEF-Streifen pI 4 bis 7 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Die aufkonzentrierte Proben wurden in Lysispuffer (30 mM TrisHCl pH 8,5; 7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% (w/v) CHAPS) aufgenommen. Waren die 2D-Gele für eine Immunoblotanalyse bestimmt wurden 5 μ g Gesamtprotein auf die IEF-Streifen geladen. Für die Analyse mittels Silberfärbung wurden hingegen 10 μ g Gesamtprotein auf die IEF-Streifen geladen. Anschließend erfolgte die passive Rehydratisierung der IEF-Streifen über Nacht in 125 μ l Rehydratisierungslösung (8 M Harnstoff; 2% (w/v) CHAPS; 2,8% (w/v) DTT; 0,5% (v/v) IPG-Puffer [pI 4 bis 7]; 0,002% Bromphenolblau). Ein Austrocknen der Streifen wurde durch Überschichtung mit PlusOne Dry-Strip Cover Fluid (GE Healthcare) verhindert.

Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte in der Ettan™ IPGphorIII (GE Healthcare) unter Einsatz des folgenden Programms:

- (i) Hold, 300 V, 600 Vh;
- (ii) Gradient, 1000 V, 500 Vh;
- (iii) Gradient, 5000 V, 10000 Vh;
- (iv) Hold, 5000 V, 2500 Vh.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IEF-Streifen entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

Vor der Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte die Äquilibration der IEF-Streifen in zwei Schritten. Zuerst wurden die IEF-Streifen für 15 min auf einem Schüttler mit Äquilibrationlösung (50 mM TrisHCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30% (v/v) Glycerin; 20% (w/v) SDS; 0,002% (w/v) Bromphenolblau) inkubiert, welcher 1% (w/v) DTT zugesetzt wurden waren. Während des zweiten Äquilibrationsschrittes enthielt die Äquilibrationlösung 2,5% (w/v) Iodacetamid und die Inkubation erfolgte wiederum für 15 min auf einem Schüttler.

Zur Herstellung eines 12%igen Trenngels für die zweite Dimension wurden 3,3 ml einer 30%igen Duracyl-Lösung (Genomic Solutions, MI, USA) mit 2,5 ml H_2O ; 2 ml 1,5M TrisHCl (pH 8,8); 80 μl SDS (10%); 40 μl APS (10%) und 2,6 μl TEMED gemischt und in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Die IEF-Streifen wurden vor der Gelelektrophorese mit einem Agarose-haltigen Puffer (25 mM TrisHCl pH 8,3; 192 mM Glyzin; 0,1% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) Agarose; 0,002% (w/v) Bromphenolblau) auf den 12%igen SDS-Gelen fixiert. Die Auftrennung erfolgte anschließend bei einer Stromstärke von 10 bis 20 mA pro Gel.

2.2.5.7 Visualisierung von Proteinen

Proteine können nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung auf verschiedene Art und Weise sichtbar gemacht werden. Hier erfolgte die Anfärbung von Proteinen in Gelen mittels Coomassie- und Silberfärbung.

Für die Färbung mit Coomassie wurden die Gele in Coomassiefärbelösung (30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,05% (w/v) Coomassie R250) gelegt und unter leichtem Schütteln bis zur Sättigung gefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung wurde das Proteingel solange mit einer 10%igen Essiglösung entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben.

Die Silberfärbung erfolgte nach dem Protokoll von Blum (Blum et al., 1987). Zunächst wurden die Proteine im Gel durch eine mindestens 2 h währende Inkubation in 40% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure fixiert. Nach der Entfernung der Fixierlösung folgte ein zweimaliges

Waschen in 30%igem (v/v) Ethanol und einmal Waschen in Wasser für jeweils 20 min. Im Anschluss an die Vorbehandlung der Polyacrylamidgele mit einer $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (0,2 g/l für 1 min) wurde 3 x 20 Sekunden mit Wasser gewaschen. Als nächstes folgte die Färbung mit Hilfe einer Silbernitrat-haltigen Lösung (2 g/l Silbernitrat; 750 $\mu\text{l/l}$ Formaldehyd für 20 min). Vor der Visualisierung des Proteinmusters durch Zugabe einer Entwicklerlösung (30 g/l Na_2CO_3 ; 500 $\mu\text{l/l}$ Formaldehyd; 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) wurde wiederum 3 x 20 Sekunden mit Wasser gewaschen. Wenn die Färbung der Proteine als ausreichend betrachtet wurde, erfolgte der Austausch der Färbelösung gegen eine Stop-Lösung (7% (v/v) Essigsäure für 10 min). Anschließend wurden die Gele 2 x 10 min in Wasser gewaschen und in eine Konservierungslösung (25% (v/v) Ethanol; 3% (v/v) Glycerin) überführt. Zum Schluss wurden die gefärbten Gele in einer geeigneten Apparatur zwischen zwei Zellophan-Membranen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgespannt und getrocknet.

2.2.5.8 Blotten und Immunodetektion von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach ihrer Auftrennung in einer Transferapparatur (BioTech Fischer, Reiskirchen, Deutschland) mit Hilfe der *Semi-Dry*-Methode auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) überführt. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (192 mM Glyzin; 25 mM Tris; 20% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v) SDS) bei 0,8 mA/cm² für 1 h. Danach wurden die Membranen in TBST (10 mM TrisHCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween20) gespült.

Zur Reduzierung der unspezifischen Bindung der Antikörper wurden die Membranen anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (5% (w/v) Trockenmilch [Bio-Rad, München, Deutschland] in TBST) geschüttelt.

Alle Immunoblotanalysen außer der Detektion des phosphorylierten TEY-Motivs und der TAP-Markierung erfolgten nach dem nachstehenden Protokoll. Dabei wurden folgende primäre Antikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet: Kaninchen- α -AtMPK3 und 4 (diese Arbeit) sowie Kaninchen- α -AtTGA2 (Gatz, C., Göttingen) 1:1.000; Kaninchen- α -AtMPK6 (diese Arbeit) 1:5.000; Kaninchen- α -Rieske/FeS (Klöggen, R.B., Halle) 1:2.000. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei Raumtemperatur in 1 x TBST mit 3% (w/v) Trockenmilch durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mindestens 3 x 15 min mit 1 x TBST gewaschen. Das Waschen der Membran wurde nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur wiederholt. Es wurden die folgenden sekundären Antikörper verwendet: Meerrettich-Peroxidase-Konjugat von α -Kaninchen-IgG (Bio-Rad) 1:10.000 und Alkalische-Phosphatase-Konjugat von α -Kaninchen-IgG (Bio-Rad) 1:3.000.

Die Detektion von phosphorylierten MAP-Kinasen mit TEY-Motiv ermöglicht der Kaninchen-Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper von Cell Signaling Technology (MA, USA). Nach Blockierung der Membran mit Blockierlösung (1 h bei Raumtemperatur) erfolgte die Inkubation mit dem Kaninchen-Phospho-p44/42 MAPK-Antikörper (Verdünnung 1:1000) über Nacht bei 4°C in 0,1 x TBST mit 3% (w/v) Trockenmilch. Vor der Inkubation mit dem 1:10.000 verdünntem sekundären Antikörper (α -Kaninchen-IgG; Bio-Rad) für 1 h bei Raumtemperatur wurde die Membran 3 x 5 min in 0,1 x TBST gewaschen. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde das Waschen der Membran wiederholt.

Der Nachweis der TAP-Markierung erfolgte mit einem gegen die Protein A-Bindedomäne gerichteten Antikörper, der direkt mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war (PAP-Antikörper, Sigma, Steinheim, Deutschland). Unspezifische Bindungsstellen wurden über Nacht durch Zugabe von 5% (w/v) Trockenmilch in TBST blockiert. Danach schlossen sich die Inkubation mit dem PAP-Antikörper (1:5.000 verdünnt in 3% (w/v) Trockenmilch in TBST) für 1 h bei Raumtemperatur sowie 3 x 15 min Waschen mit TBST an.

Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich entweder um ein Meerrettich-Peroxidase-Konjugat oder um ein Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Die Detektion der Meerrettich-Peroxidase wurde nach der Inkubation der Membran mit dem ECL plus Western Blotting Detektionssystem von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) und anschließender Belichtung eines Films (Pierce, IL, USA) durch die Emission von Photonen möglich. Die Entwicklung der Filme erfolgte in der Maschine „COMPACT 2 X-Ray Film Prozessor“ (Protec Medizintechnik, Oberstenfeld, Deutschland). Die Reaktion der Alkalischen Phosphatase konnte hingegen nach Zugabe der Substrate NBT und BCIP entsprechend dem Herstellerprotokoll (Promega, Mannheim, Deutschland) direkt auf der Membran nachgewiesen werden.

Um Aufschluss über die Beladung einer für die Immunodetektion verwendeten Nitrocellulose-Membran zu bekommen, wurde die Membran in Wasser gespült und anschließend für 5 min in einer Färbelösung (7% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Amidoschwarz) inkubiert. Durch Waschen in Wasser konnten schließlich die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

2.2.5.9 Nachweis der Kinaseaktivität mit Hilfe von Immunopräzipitation

Die Antikörper, welche für die Immunopräzipitation verwendet werden sollten, wurden zuerst an Protein A Sepharose CL-4B (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gebunden. Dazu wurde eine Protein A Sepharose CL-4B Suspension dem Herstellerprotokoll folgend unter Verwendung von Puffer A (50 mM TrisHCl pH 7,4; 250 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 5 mM NaF; 0,1% (v/v) Tween 20) aus lyophilisierter Protein A Sepharose CL-4B

hergestellt. Anschließend wurde 1 ml der 50%igen (v/v) Sepharosesuspension mit 200 µg des gereinigten Antikörpers versetzt und das Gemisch unter ständigem Drehen bei 4°C für mindestens 90 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation (4°C, 900 x g, 2 min) folgte das dreimalige Waschen der Suspension mit Puffer A. Der gebundene Antikörper wurde in einem Volumen Puffer A aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Nach Inkubation des Proteinextrakts (50 µg Protein) mit 30 µl der Antikörper-Sepharosesuspension für mindestens 1 h bei 4°C wurden die gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe durch Zentrifugation (4°C, 900 x g, 2 min) gefällt. Nach Entfernen des Überstandes folgte dreimaliges Waschen mit Puffer B (20 mM TrisHCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100) sowie jeweils einmal Waschen mit Puffer C (20 mM TrisHCl pH 7,4; 1 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100) und D (20 mM HEPES, pH 7,5; 15 mM MgCl₂; 5 mM EGTA; 1 mM DTT). Anschließend ermöglichte eine 30 minütige Inkubation in Kinasepuffer A (20 mM HEPES, pH 7,5; 15 mM MgCl₂; 5 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mg/ml MBP; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Aprotinin; 50 µCi/ml [γ -³²P]ATP) bei 37 °C eine *in vitro* Kinasereaktion, welche zur Phosphorylierung des *myelin basic protein* (MBP) führt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen (3 min, 95°C) abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Trocknen des Gels mit Hilfe eines „Typhoon Variable Mode Imagers“ (GE Healthcare) autoradiographisch analysiert.

2.2.5.10 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF MS

Die Proteine aus silbergefärbten Gelen, welche mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden sollten, wurden ausgeschnitten und nach dem Protokoll des „SilverQuest™-Kits“ (Invitrogen, Groningen, Niederlande) entfärbt. Für die Entfärbung wurde jedes Gelstück mit 50 µl Entfärbelösung A (30 mM K₃Fe(CN)₆) und 50 µl Entfärbelösung B (100 mM Na₂S₂O₃) gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl Wasser folgten die Dehydrierung (100% Methanol für 5 min) und die Rehydrierung (30% Methanol (v/v) für 5 min) der Gelstücke.

Daraufhin wurde zweimal mit Wasser und dreimal mit 30% (v/v) Acetonitril in 100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,5 für jeweils 10 min gewaschen. Daran schlossen sich die Zerkleinerung der Gelstücke, ein nochmaliges Spülen mit Wasser und das Trocknen der Gelstücke im Rotations-Vakuumkonzentrator (*Speed-Vac*) an. Danach wurden die getrockneten Gelstücke mit ca. 5 µl/mm² Verdau-Puffer (50 mM NH₄CO₃ pH 8,5; 5% (v/v) Acetonitril) versetzt und 5 bis 10 ng/µl Trypsin zugegeben. Über Nacht quoll das Gelmaterial und die darin enthaltenen Proteine wurden bei Raumtemperatur proteolytisch gespalten. Nach

dem Verdau konnten die Peptide durch Beimischung von Extraktionspuffer (50% (v/v) Acetonitril; 0,1% (v/v) TFA) extrahiert werden und die Extrakte wurden in der *Speed-Vac* eingetrocknet.

In Vorbereitung auf die MALDI-TOF-Analyse wurden 5 g der MALDI-Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB) in einem Liter eines Gemisches aus 1:2 Acetonitril und 0,1% TFA aufgenommen. Anschließend wurden die eingetrockneten Extrakte in 0,5 µl der MALDI-Matrix 2,5-DHB aufgenommen und auf 400 µm AnchorChip™ MALDI-Platten (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgetragen. Die Messung der Massenspektren mit einem Bruker Daltonics REFLEX III im Reflecton-Modus war nach der Kristallisierung der Proben möglich.

2.2.6 Computergestützte Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen für die Analyse von Sequenzdaten, 2D-Gelen und MS-Daten verschiedene Computerprogramme zum Einsatz. Für den Sequenzvergleich aller 20 putativen MAPKs aus *Arabidopsis thaliana* wurden die Programme Vektor NTI (Invitrogen, Groningen, Niederlande) und Multalin (*Expaty Proteomics Server*; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988) verwendet. Vektor NTI ist ein Programm zur Sequenz- und Restriktionsanalyse sowie zum Design von Oligonukleotiden und ermöglichte die zusammenfassende Darstellung des Sequenzvergleichs in Form eines Diagramms. Detaillierte Auszüge aus dem Sequenzvergleich wurden mit Hilfe von Multalin erstellt.

Bei der vergleichenden Untersuchung von 2D-Gelen sind Programme wie Proteomweaver Version 4.0 (Definiens, München, Deutschland) besonders hilfreich. Proteomweaver erkennt und klassifiziert auf digitalisierten 2D-Gelen alle Spots unabhängig von Größe und Anzahl.

Zur Analyse von massenspektrometrischen Daten wurde die Programme mMass (<http://mmass.biographics.cz>) und MASCOT (Matrix Science, London, UK) eingesetzt. Bei mMass handelt es sich um ein freiverfügbares Programm, welches verschiedene Werkzeuge zur Handhabung von Proteinsequenzen und der Interpretation von Massenspektren bietet. MASCOT ist eine Suchmaschine, die MS-Daten benutzt um Proteine aus Sequenzdatenbanken zu identifizieren.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Antikörpern gegen Proteinkinasen aus ausgewählten MAPK-Kaskaden

Basierend auf der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von immunologischen Techniken entwickelt, welche den Nachweis und die Analyse von Proteinen, Polysacchariden und anderen Makromolekülen ermöglichen. Die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen die hier untersuchten MAPKs 3, 4 und 6 aus *Arabidopsis thaliana* stellte deshalb eine wichtige Grundlage für deren Analyse dar.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden 20 Gene identifiziert, die wahrscheinlich MAPKs kodieren (MAPK-Group, 2002). Obwohl diese 20 putativen MAPKs (AtMPK1 bis 20) in zwei Subtypen und mindestens 4 Gruppen eingeteilt werden können, sind sie über weite Bereiche zueinander homolog. Unterschiede in der Sequenz der 20 putativen MAPKs finden sich hauptsächlich im N- und im C-Terminus der Proteine (Abb. 3.1). Die Verwendung von vollständigen MAPK-Proteinen als Antigen würde daher zur Erzeugung von Antikörpern führen, die mit mehreren der 20 putativen MAPKs Antigen-Antikörper-Reaktionen eingehen können. Um das Risiko der Herstellung von kreuzreaktiven Antikörpern zu reduzieren, kamen synthetische Peptide als Antigene zum Einsatz, deren circa 20 Aminosäuren umfassende Sequenz vom N-terminalen Bereich der MAPKs 3, 4 und 6 abgeleitet worden war.

Die aus der Immunisierung resultierenden Antiseren wurden als erstes an den rekombinanten GST-Fusionsproteinen der AtMPKs 3, 4, 6 und 11 getestet. Die AtMPK11 wurde in diesen Versuch einbezogen, da der N-terminale Bereich dieser MAPK dem der AtMPK4 ähnelt (Abb. 3.2 A). Die Abbildung 3.2 B zeigt, dass alle Antiseren nur das entsprechende rekombinante Protein erkennen. Eine Kreuzreaktion des gegen AtMPK4 gerichteten Antiserums mit dem rekombinanten Protein GST-AtMPK11 findet nicht statt (Abb. 3.2 B).

Im nächsten Schritt galt es, die MAPKs 3, 4 und 6 mit Hilfe von Immunodetektion in Proteinextrakten aus Zellkultur- bzw. Blattmaterial nachzuweisen. Für alle Antiseren konnte gezeigt werden, dass sie in ungereinigter Form stets mehrere Proteine erkennen (Abb. 3.3 bis 3.5 jeweils Abschnitt A). Nach einer Inkubation mit dem entsprechenden vor der Immunisierung des Kaninchens entnommenen Präimmunserum sind hingegen keine Proteine detektierbar und somit wurden erst nach der Immunisierung eine Vielzahl

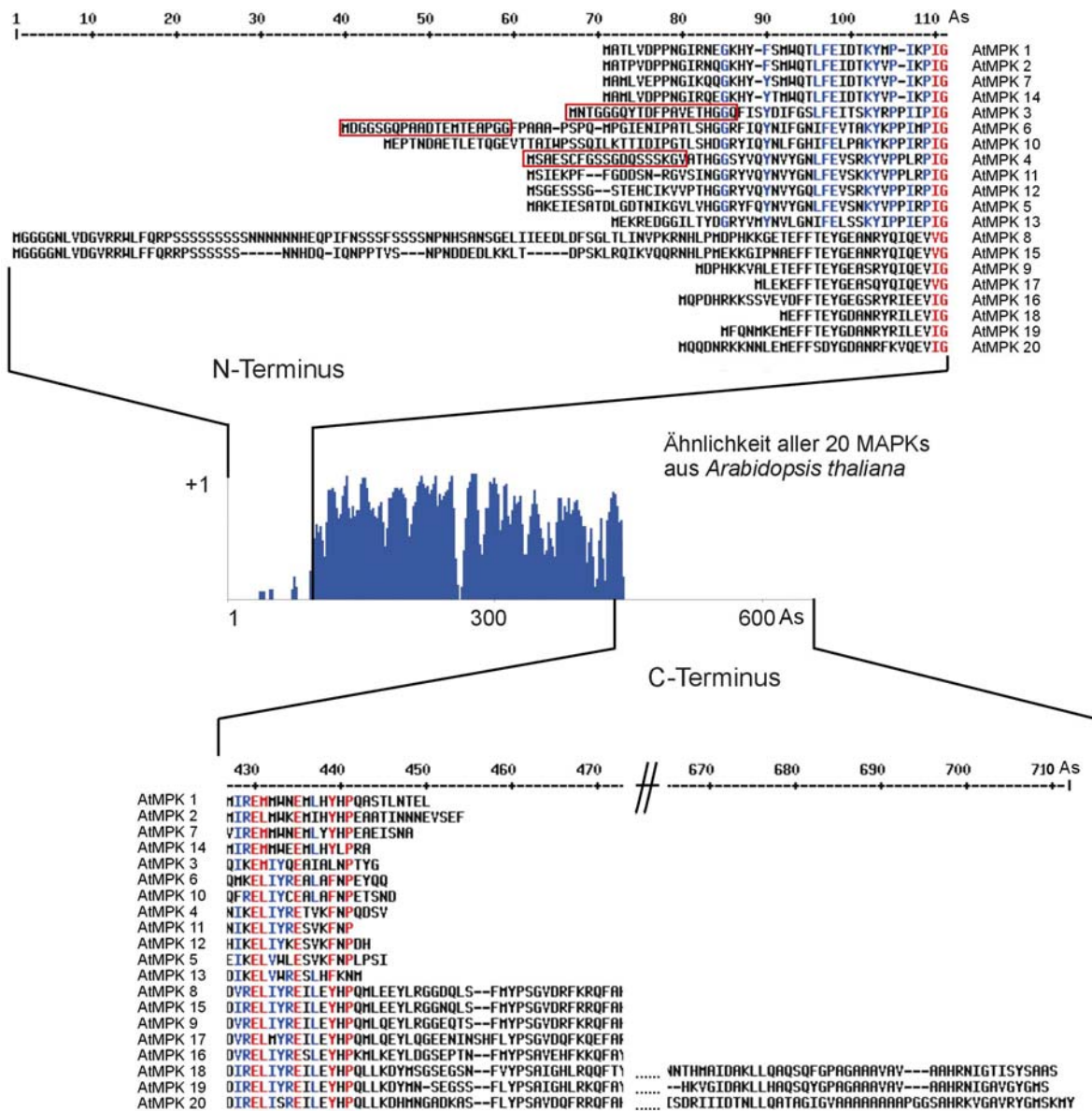


Abb. 3.1 Sequenzvergleich aller 20 (putativen) MAPKs aus *Arabidopsis thaliana*. Mit Ausnahme des N- und C-terminalen Bereiches zeigen die 20 putativen MAPKs einen hohen Grad an Homologie. Der mittlere Teil der Abbildung verdeutlicht den hohen Grad der Ähnlichkeit aller 20 putativen MAPKs zueinander anhand eines mit dem Programm VektorNTI erstellten Diagramms. Ein Wert von +1 entspricht dabei einer Übereinstimmung einer Aminosäure (As) in der Sequenz aller MAPKs. Im oberen und unteren Teil der Abbildung sind die Sequenzen aus dem N- und dem C-Terminus aller 20 putativen MAPKs dargestellt. Die Alignments wurden mit dem Programm Multalin erstellt, welches einzelne Aminosäuren in Abhängigkeit vom Grad der Übereinstimmung verschiedenfarbig markiert. Rot gekennzeichnet sind Aminosäuren, die in mindestens 90% aller Sequenzen identisch sind. Ab einer Übereinstimmung von mindestens 50% erfolgt die Markierung der einzelnen Aminosäuren in blau. Wenn einzelne Aminosäuren in weniger als 50% aller Sequenzen identisch sind, dann sind die Aminosäuren in schwarz dargestellt. Die Bereiche in den N-Termini der AtMPK3, 4 und 6, welche als Vorlage für die Synthese der Peptidepitope dienten, sind rot umrahmt.

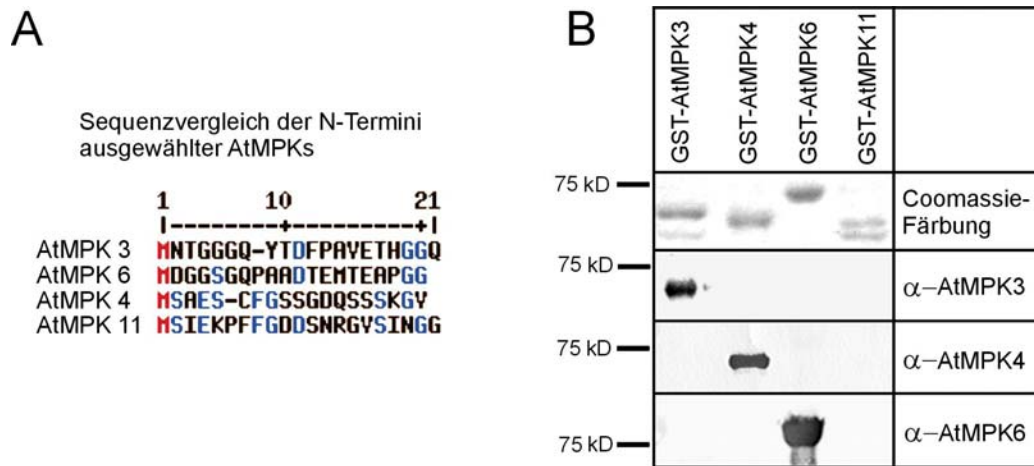


Abb. 3.2 Spezifität der Antikörper gegen AtMPK3, 4 und 6 gezeigt anhand der Erkennung der rekombinanten Fusionsproteine GST-AtMPK3, 4 und 6. **(A)** Sequenzvergleich der N-Termini ausgewählter AtMPKs. Abgebildet sind die Sequenzen der Peptide, die bei der Immunisierung von Kaninchen als Peptidantigene eingesetzt wurden, sowie die Sequenz des N-Terminus von AtMPK11, der eine hohe Ähnlichkeit mit AtMPK4 aufweist. Die Abbildung wurde mit Multalin erstellt und entsprechend der Abbildung 3.1 markiert. **(B)** Spezifische Erkennung von rekombinantem GST-AtMPK3, 4 und 6 durch die gegen AtMPK3, 4 und 6 gerichteten Antikörper. Die Immunodetektion erfolgte nach Auftrennung von jeweils 1 µg rekombinantem Fusionsprotein in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. Zum Einsatz kam dabei ein mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelter sekundärer Antikörper.

von Antikörpern gebildet, die neben AtMPK3, 4 und 6 weitere Proteine identifizieren. Der Hintergrund der Immunodetektion konnte sowohl durch intensives Waschen als auch durch Verwendung einer weniger sensitiven Nachweismethode wie der Reaktion der Alkalischen Phosphatase nicht auf ein tolerierbares Maß reduziert werden.

Infolgedessen erforderte die Erzeugung monospezifischer Antiseren gegen AtMPK3, 4 und 6 eine Reinigung der Rohseren mittels Affinitätschromatographie. Im Anschluss an die Affinitätsreinigung der Peptidantikörper wurden nach Inkubation mit den Antiseren gegen AtMPK3 bzw. 6 nur noch ein ca. 40 kD bzw. ca. 45 kD großes Protein detektiert (Abb. 3.3 und 3.5). Da diese Molekulargewichte in etwa denen der AtMPK3 (42 kD) und AtMPK6 (45 kD) entsprechen, konnte auf diese Weise die Spezifität der Antiseren gegen AtMPK 3 und 6 erheblich verbessert werden. Auf Grund der höheren Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren wurde die Verwendung des sensitiveren Nachweis mittels Meerrettich-Peroxidase möglich. Wurde während der Immunodetektion das antigene, N-terminale AtMPK3- bzw. AtMPK6-Peptid (3NT bzw. 6NT) zugegeben, blieb die Erkennung des putativen AtMPK3- bzw. AtMPK6-Proteins aus. Endgültig bewiesen werden konnte die Spezifität der Antiseren erst, nachdem die entsprechenden *knock out*-Linien zur Verfügung standen. Sowohl das Serum gegen AtMPK3 als auch das Serum gegen AtMPK6 enthalten Antikörper, welche bei fehlender Expression von AtMPK3 bzw. AtMPK6 kein Protein mehr detektieren (Abb. 3.3 B und 3.5 B). Nach der Affinitätsreinigung des AtMPK4-Rohserums gelang mit selbigem der Nachweis eines putativen AtMPK4-Proteins mit einem Molekulargewicht von circa 40 kD. Gleichzeitig

wurde in Zellkulturextrakten jedoch noch ein etwa 50 kD großes Protein und in Blattextrakten ein etwa 37 kD großes Protein detektiert (Abb. 3.4). Da sich durch Zugabe des N-terminalen AtMPK4-Peptides (4NT) als Kompetitor die Erkennung aller Proteine hemmen ließ, ist davon auszugehen, dass sowohl das 50 kD Protein als auch das 37 kD-Protein zumindest Teile des 4NT-Peptides als Epitop enthalten. Weil das 37 kD Protein auch in Blättern der AtMPK4 *knock out*-Linie nachweisbar war, konnte es sich nicht um ein Abbauprodukt von AtMPK4 handeln (Abb. 3.4 B). In Ermangelung einer AtMPK4 *knock out*-Linie für Zellsuspensionskulturen konnte nicht definitiv ausgeschlossen werden, ob bei dem 50 kD-Protein eine modifizierte Form von AtMPK4 vorlag. Diese Erklärung ist allerdings unwahrscheinlich, da antigene Determinanten in der Regel eine Größe von fünf bis acht Aminosäuren haben und somit Probleme mit Kreuzreaktionen auch bei einem 20 Aminosäuren langen Peptidantigen auftreten können. Auf Grund der schlechten Qualität des gegen AtMPK4 gerichteten Antiserums wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit keine Experimente damit durchgeführt.

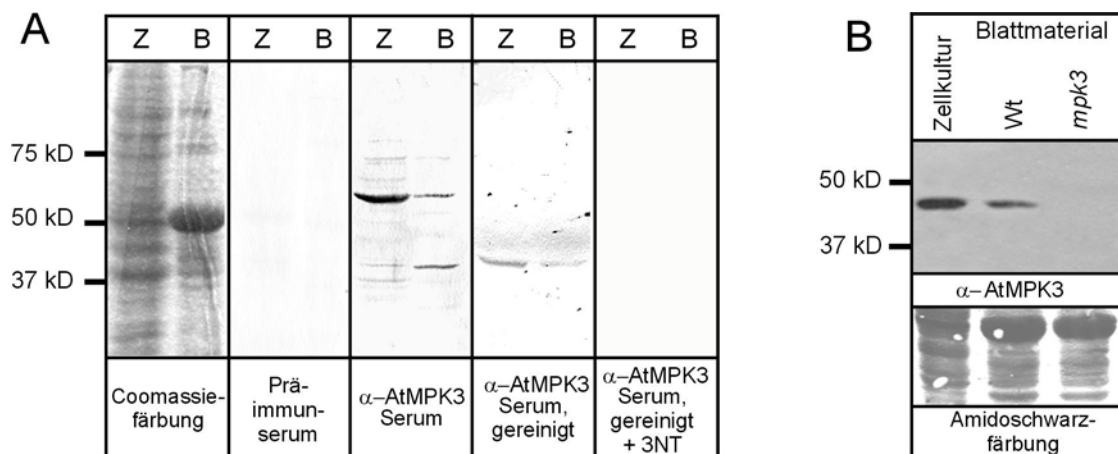


Abb. 3.3 Spezifität des Antikörpers gegen AtMPK3 gezeigt anhand der Erkennung von AtMPK3 aus Zellkultur- und Blattmaterial. **(A)** Jeweils 30 μ g Protein eines Totalextraktes aus Zellkultur- bzw. Blattmaterial (Z bzw. B) wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Danach folgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Seren bzw. einer Mischung aus gereinigtem α -AtMPK3-Serum mit dem aus dem N-Terminus von AtMPK3 abgeleiteten Peptid (3NT). Detektiert wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer an den sekundären Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase. **(B)** Gezeigt ist die Detektion von AtMPK3 in 30 μ g Gesamtprotein durch Immunoblot mit dem gereinigten α -AtMPK3-Serum und nachfolgender Meerrettichperoxidase-Reaktion in Zellkultur- bzw. Blattmaterial von Wildtyp und AtMPK3 *knock out* (*mpk3*). Als Ladekontrolle dienten die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinblots.

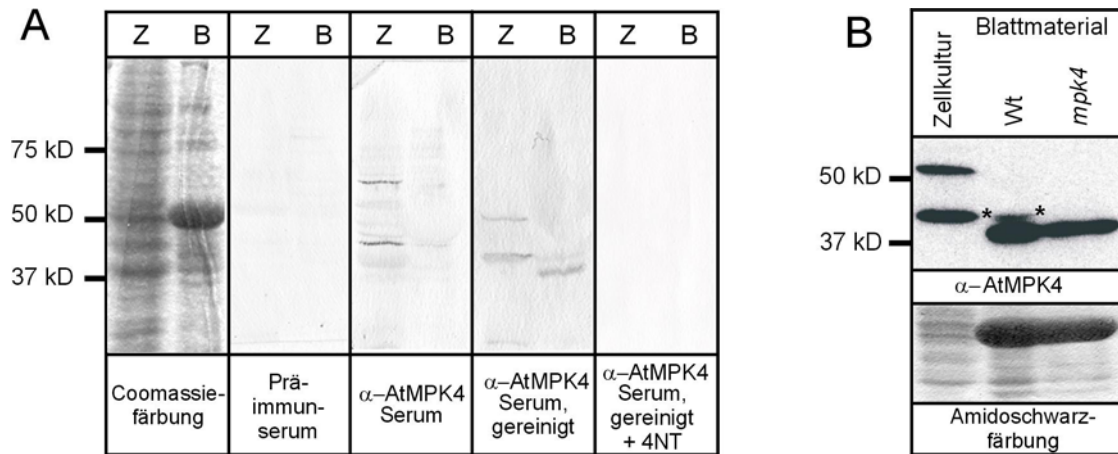


Abb. 3.4 Spezifität des Antikörpers gegen AtMPK4 gezeigt anhand der Erkennung von AtMPK4 aus Zellkultur- und Blattmaterial. **(A)** Jeweils 30 μ g Protein eines Totalextraktes aus Zellkultur- bzw. Blattmaterial (Z bzw. B) wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Danach folgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Seren bzw. einer Mischung aus gereinigtem α -AtMPK4-Serum mit dem aus dem N-Terminus von AtMPK4 abgeleiteten Peptid (4NT). Detektiert wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer an den sekundären Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase. **(B)** Gezeigt ist die Detektion von Proteinen aus 30 μ g Gesamtprotein durch Immunoblot mit dem gereinigten α -AtMPK4-Serum und nachfolgender Meerrettichperoxidase-Reaktion in Zellkultur- bzw. Blattmaterial von Wildtyp und AtMPK4 *knock out* (*mpk4*). Die Bande, die dem AtMPK4-Protein entspricht ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Als Ladekontrolle dienten die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinblots.

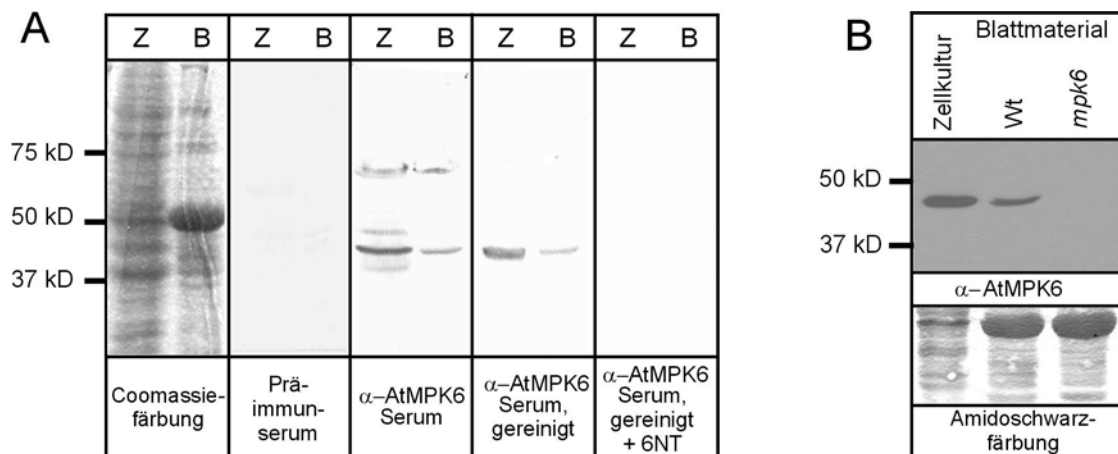


Abb. 3.5 Spezifität des Antikörpers gegen AtMPK6 gezeigt anhand der Erkennung von AtMPK6 aus Zellkultur- und Blattmaterial. **(A)** Jeweils 30 μ g Protein eines Totalextraktes aus Zellkultur- bzw. Blattmaterial (Z bzw. B) wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Danach folgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Seren bzw. einer Mischung aus gereinigtem α -AtMPK6-Serum mit dem aus dem N-Terminus von AtMPK6 abgeleiteten Peptid (6NT). Detektiert wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer an den sekundären Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase. **(B)** Gezeigt ist die Detektion von AtMPK6 in 30 μ g Gesamtprotein durch Immunoblot mit dem gereinigten α -AtMPK6-Serum und nachfolgender Meerrettichperoxidase-Reaktion in Zellkultur- bzw. Blattmaterial von Wildtyp und AtMPK6 *knock out* (*mpk6*). Als Ladekontrolle dienten die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinblots.

3.2 Hinweise auf die Anwesenheit von AtMPK3 und AtMPK6 in Proteinkomplexen

Ziel dieser Arbeit war die Suche nach Proteinen, die mit MAPKs aus *Arabidopsis thaliana* interagieren. Zunächst sollten Anhaltspunkte dafür gesammelt werden, ob AtMPK3 und 6 überhaupt als Teil von Proteinkomplexen nachweisbar sind. Der Nachweis von Proteinkomplexen, an deren Aufbau AtMPK3 bzw. 6 beteiligt sind, stellte eine wichtige Voraussetzung für weitere Experimente zur Identifizierung von putativen Interaktionspartnern dar.

Um Hinweise darüber zu erhalten, ob ein zu untersuchendes Protein Bestandteil von Proteinkomplexen ist, kann man sich verschiedenster Methoden bedienen. So konnten mittels Blauer Nativer (BN)-Gelelektrophorese für viele Membranproteine Informationen über deren Präsenz in Proteinkomplexen gesammelt werden (Eubel et al., 2005). Außerdem gelang mit dieser Methode bereits die Auftrennung von Multiproteinkomplexen aus unverarbeiteten Zellysaten und die Identifizierung von Proteinen aus diesen Komplexen durch Massenspektrometrie (Camacho-Carvajal et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vorversuche, mit Hilfe von BN-Gelelektrophorese Hinweise auf die Anwesenheit von AtMPK3 und 6 in Proteinkomplexen zu erhalten, waren nicht erfolgreich.

Eine weitere Möglichkeit lösliche Proteinextrakte in nativer Form aufzutrennen, bietet der Einsatz von Ausschlusschromatographie. Bei dieser Form der Chromatographie werden gelöste Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Dabei kommt es zu einer längeren Verweildauer von kleineren Molekülen oder Monomeren im porösen Trägermaterial und somit zu einer späteren Elution dieser kleinen Analyten. Mittels Ausschlusschromatographie gelang beispielsweise die Charakterisierung des *Arabidopsis thaliana* COP9-Signalosoms (Peng et al., 2001; Feng et al., 2003). Die Arbeiten über das COP9-Signalosom waren die Grundlage für die hier gezeigten Untersuchungen von AtMPK3 und 6 durch Ausschlusschromatographie.

3.2.1 Auswahl eines geeigneten Extraktionspuffers

Faktoren wie die Konzentration von Salzen und die Anwesenheit von Detergenzien beeinträchtigen die Stabilität von Proteinkomplexen maßgeblich. Ferner können Proteinkomplexe durch Zugabe von Glycerin zum Extraktions- und Laufpuffer stabilisiert werden. In Anlehnung an Feng et al. (2003) wurden dem Extraktions- und Laufpuffer daher 100 mM NaCl und 10 mM MgCl₂ sowie 10% Glycerin zugegeben.

AtMPK3 und 6 können nach Aktivierung infolge von Ozon- bzw. Flagellinbehandlung teilweise auch im Zellkern lokalisiert sein (Ahlfors et al., 2004; Bethke, 2004). Die vollständige Extraktion von Proteinen aus dem Zellkern erfolgt normalerweise unter

Hochsalzbedingungen und/oder durch Zugabe von Detergenz (Staiger et al., 1989; Yukawa et al., 2001; Sanchez et al., 2007). Diese Bedingungen sind jedoch nicht mit der nativen Präparation von Proteinen kompatibel. Zudem ist bekannt, dass nichtionische Detergenzien weniger stark mit Protein-Protein-Wechselwirkungen interferieren und weniger denaturierend wirken als ionische Detergenzien. Demzufolge ist der Einsatz von nichtionischen Detergenzien in geringer Konzentration bei der nativen Präparation von Proteinen nicht von vornherein ausgeschlossen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die nichtionischen Detergenzien Tween 20 und NP 40 getestet, welche im Kinaseextraktionspuffer bzw. in den Puffern für die Tandemaffinitätsreinigung zu jeweils 0,1% enthalten sind. Relativ milde Bedingungen für die Präparation von Zellkernen und die anschließende Proteinextraktion wurden bereits im Rahmen einer Untersuchung von Interphase-Chromosomen im nativen Zustand angewandt (Yoshimura et al., 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass in HeLa-Zellen durch eine Behandlung mit 0,5% des nichtionischen Detergenz Triton X-100 nicht nur die Plasmamembran entfernt wurde, sondern auch das endoplasmatische Retikulum und die Kernmembran zerstört wurden. Eine teilweise Extraktion von Kernproteinen gelang anschließend durch Inkubation der Zellen mit einem Puffer, der eine moderate Salzkonzentration von 250 mM Ammoniumsulfat aufwies (Yoshimura et al., 2003). Folglich ist zu vermuten, dass durch eine mechanische Behandlung von Pflanzenmaterial (gründliches Mörsern in flüssigem Stickstoff) und die Verwendung eines Extraktionspuffers mit geringer Detergenz- sowie Salzkonzentration die Zellkerne zumindest beschädigt werden.

Die hier untersuchten Totalextrakte wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und AtMPK3 bzw. 6 mittels Immunodetektion nachgewiesen (Abb. 3.6). Die Zugabe von 0,1% Tween 20 bzw. 0,1% NP 40 zum Extraktionspuffer hatte keinen Einfluss auf die nachweisbare Menge an AtMPK3 und 6 und somit auch nicht auf die Effizienz der Extraktion von AtMPK3 und 6. Ein geeigneter Antikörper gegen ein im Zellkern lokalisiertes Protein stand für diesen Vorversuch nicht zur Verfügung. Jedoch konnte durch den Nachweis des in Chloroplasten lokalisierten Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins gezeigt werden, dass es nach Zusatz von 0,1% NP 40 zum effektivsten Aufschluss der Chloroplasten kam (Abb. 3.6).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden dem Extraktionspuffer für die Untersuchung von Totalextrakten mittels Ausschlusschromatographie keine Detergenzien zugesetzt. Dieses Vorgehen steht in Übereinstimmung mit Peng et al. (2001) und Feng et al. (2003). In ihren Studien zum COP9-Signalosom wurde dem verwendeten Extraktionspuffer ebenfalls kein Detergenz beigemischt, obwohl es sich beim COP9-Signalosom um einen im Zellkern angereicherten Multiproteinkomplex handelt (Peng et al., 2001; Feng et al., 2003).

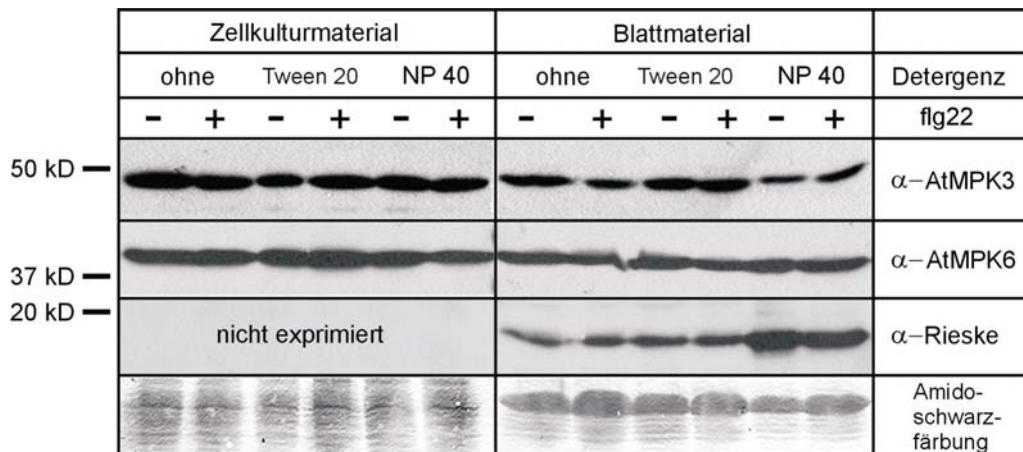


Abb. 3.6 Einfluss von Detergenzien auf die Effizienz der Extraktion von AtMPK3 und 6 aus unbehandeltem sowie flg22-behandeltem Zellkultur- und Blattmaterial. Durch Zugabe von je 0,1% Tween 20 und NP 40 zum Extraktionspuffer konnte der im Totalextrakt vorhandene Anteil an AtMPK3 und AtMPK6 auch im Fall von flg22-behandeltem Pflanzenmaterial nicht erhöht werden. Nach Auftrennung von je 20 μ g Protein in Form eines löslichen Totalextraktes durch SDS-Gelelektrophorese wurden AtMPK3, AtMPK6 und das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein mittels Immunoblot nachgewiesen. Als Ladekontrolle dienten die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinblots.

3.2.2 Analyse von Totalproteinextrakten mit Hilfe von Ausschlusschromatographie

Die Elutionsprofile von AtMPK3 und 6 nach der Ausschlusschromatographie sollten Hinweise geben, ob diese MAPKs als Bestandteil von Proteinkomplexen vorliegen. Ermittelt wurden die Elutionsprofile, nachdem die bei der Chromatographie gesammelten Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und AtMPK3 und 6 anschließend mittels Immunodetektion nachgewiesen wurden. Die Immunoblotanalyse mit den hier erzeugten Antikörpern gegen AtMPK3 und 6 ermöglichte sowohl den Nachweis der entsprechenden MAPKs in inaktiver als auch in aktiver Form. Um die Elutionsprofile von AtMPK3 und 6 nach Aktivierung durch den Elizitor flg22 (Nuhse et al., 2000; Asai et al., 2002) und das nicht wirtsspezifische Toxin *NepI-like protein* aus *Phytophthora sojae* (NLP_{Ps}) (Qutob et al., 2006) zu erhalten, wurde ein Antikörper gegen das phosphorylierte TEY-Motiv verwendet. Das TEY-Motiv stellt eine Form des konservierten Threonin-Tyrosin-Motivs (TxY) dar, welches sich in der Aktivierungsschleife der MAPKs befindet und durch MAP2Ks phosphoryliert wird (MAPK-Group, 2002).

3.2.2.1 Elutionsprofile von AtMPK3 und AtMPK6 aus *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen

Untersucht wurden unbehandelte und mit dem Peptid flg22 elizitierte *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen. Die Erkennung von flg22 erfolgt über den Rezeptor FLS2 und führt zur Aktivierung von AtMPK3 und 6 (Asai et al., 2002) sowie AtMPK4 (Meszaros et al., 2006).

Aus Abbildung 3.7 ist ersichtlich, dass sich die Elutionsprofile von AtMPK 3 und 6 nach Behandlung mit flg22 nicht wesentlich von den Elutionsprofilen der unbehandelten Zellkultur unterscheiden. Die Elution von AtMPK3 wies zwei Maxima auf. Einerseits konzentrierte sich AtMPK3 in den Fraktionen 15 bis 19, welches in etwa einem Molekulargewicht von 150 bis 100 kD entsprach. Da AtMPK3 als Monomer ein Molekulargewicht von 42 kD hat, konnte somit ein Hinweis über die Anwesenheit von AtMPK3 in Proteinkomplexen erbracht werden. Andererseits erreichte die Elution von AtMPK3 einen zweiten Höchstwert zwischen Fraktion 23 und 29. Im Mittel eluierten in diesem Bereich Proteine mit einem Molekulargewicht von circa 45 kD. Deshalb handelte sich hier um AtMPK3-Monomere.

Die Elution von AtMPK6 erstreckte sich über einen sehr breiten Bereich von Fraktion 9 bis 27 (Abb. 3.7). In diesem Gebiet eluierten Proteinkomplexe und Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 325 kD bis 40 kD. Bei genauer Analyse des Elutionsprofils von AtMPK6 werden zwei leichte Maxima im Bereich um Fraktion 17 bzw. 23 erkennbar. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte wie im Falle von AtMPK3 davon ausgegangen werden, dass AtMPK6 sowohl als Teil von Multiproteinkomplexen als auch als Monomer (45 kD) in Totalextrakten von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen vorlag. Grundlegende Probleme bei der Elution, welche die breite Elution von AtMPK6 verursacht haben könnten, ließen sich nahezu ausschließen. Einerseits eluierten phosphorylierte AtMPK6 und die Gesamtmenge an AtMPK3 sehr fokussiert. Andererseits zeigte sich auch in der Amidoschwarzfärbung des Proteinblots, dass abundante Proteine über einen eng begrenzten Bereich hinweg eluierten.

Die nach flg22-Behandlung am TEY-Motiv dualphosphorylierten AtMPK3, 4 und 6 konnten mit dem entsprechenden Antikörper hauptsächlich in den Fraktionen 13 bis 19 sowie zu einem geringern Anteil in den Fraktionen 23 bis 27 detektiert werden (Abb. 3.7). Da sich das Molekulargewicht der AtMPK6 (45 kD) von dem der AtMPK3 und 4 (42 kD) unterscheidet, lässt sich die oberste Bande im mit α -TpEYp analysierten Elutionsprofil eindeutig der AtMPK6 zuordnen. Wie Abbildung 3.7 zeigt, eluierte die aktivierte AtMPK6 somit fast ausschließlich in höhermolekularen Fraktionen zwischen 200 kD und 100 kD.

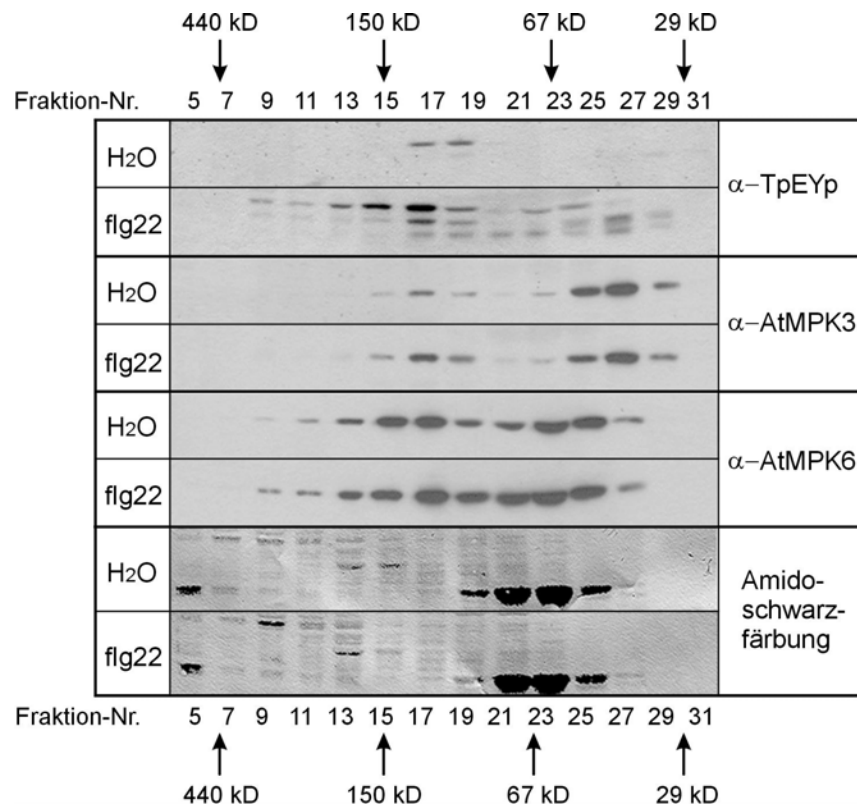


Abb. 3.7 AtMPK3 und 6 sind in *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen wahrscheinlich Bestandteil von Multiproteinkomplexen. Lösliche Totalextrakte von unbehandelten und flg22-behandelten Zellsuspensionskulturen wurden mittels Ausschlusschromatographie über eine Superdex200 PrepGrade-Säule aufgetrennt und einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurde durch Immunoblotanalyse mit den angegebenen Antikörpern das Elutionsprofil der phosphorylierten aktiven MAPKs sowie der Gesamtmenge an AtMPK3 und 6 nachgewiesen. Mit Hilfe von Amidoschwarzfärbung wurden die geladenen Proteinmengen nach der Auftrennung und der Immunoblotanalyse angefärbt.

Aussagen über die Identität der mittleren und untersten Bande im mit α -TpEYp analysierte Elutionsprofil ließen sich nur auf Grund einer vergleichenden Analyse mit dem Laufverhalten von rekombinantem AtMPK3- und AtMPK4-Protein treffen. Aus Abbildung 3.2 wird ersichtlich, dass AtMPK4 trotz nahezu identischem Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel schneller wanderten als AtMPK3. Wenn man dieses Laufverhalten auf Abbildung 3.7 überträgt, dann sollte es sich bei der mittleren Bande um phosphorylierte AtMPK3 und bei der untersten Bande um phosphorylierte AtMPK4 handeln. Basierend auf dieser Annahme eluierte die aktivierte Form von AtMPK3 ähnlich wie die Gesamtmenge an AtMPK3 in zwei Maxima. Die Elution des aktivierten Anteils von AtMPK4 erfolgte hingegen in einem Bereich von Fraktion 17 bis 27, was einem Molekulargewicht von circa 125 kD bis 40 kD entsprach.

3.2.2.2 Elutionsprofile von AtMPK3 und AtMPK6 aus flg22-behandelten *Arabidopsis thaliana*-Blättern

Neben Zellkulturen wurden auch Blätter mit dem Elizitor flg22 behandelt. Dabei erfolgte die Applikation von flg22 durch möglichst großflächige Infiltration einer 10 μ M wässrigen flg22-Lösung in die Blattunterseite. Prinzipiell werden durch Infiltration auch die Verwundungsreaktionen der Pflanze aktiviert. Zu diesen Wundantworten zählt unter anderem die Aktivierung von MAPKs. In *Arabidopsis thaliana* kommt es dabei zu einer Aktivierung von Signalwegen, an denen AtMPK4 und 6 beteiligt sind (Ichimura et al., 2000). Die Kombination von Verwundungsstress und Pathogenstress in Form einer Infiltration von flg22 resultiert allerdings in *Arabidopsis thaliana*-Blättern in einer stärkeren Aktivierung der entsprechenden MAPKs 3, 4 und 6 als Verwundungsstress allein (Abb. 3.8 Immunoblot mit α -TpEYp).

Die Elutionsmuster von AtMPK3 und 6 aus Blattmaterial vor und nach Stressbehandlung glichen einander (Abb. 3.8). Im Gegensatz zur Elution von AtMPK3 aus Zellkulturmaterial (Abb. 3.7) eluierte aus Blattmaterial extrahierte AtMPK3 in nur einem Maximum, welches sich von Fraktion 25 bis 29 erstreckte. Im Durchschnitt entsprach dies einem Molekulargewicht von circa 40 kD und somit dem Monomer von AtMPK3 (Abb. 3.8).

Die Elution von AtMPK6 wies ein Maximum auf, das die Fraktionen 21 bis 25 umfasste (Abb. 3.8). Jedoch konnte das Protein bereits beginnend mit Fraktion 9 in geringen Mengen immunologisch nachgewiesen werden. Die stete Zunahme bis zum Maximum lässt dennoch darauf schließen, dass AtMPK6 in Blättern hauptsächlich als Monomer vorliegt. Nur ein geringer Anteil eluierte in Fraktionen, die Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 325 kD bis 100 kD enthielten.

Das Elutionsverhalten von den durch Phosphorylierung des TEY-Motivs aktivierten MAPKs wurde mit Hilfe des α -TpEYp-Antikörpers ermittelt. Dabei entspricht die obere Bande der aktivierten AtMPK6 und die untere Bande vermutlich der aktivierten AtMPK3 (Abb. 3.8). Die dualphosphorylierte AtMPK6 konnte nach der nativen Auftrennung der Totalextrakte in den Fraktionen detektiert werden, die dem Elutionsmaximum der Gesamtmenge von AtMPK6 entsprachen. Auch im Fall der phosphorylierten AtMPK3 deckt sich das Elutionsmuster mit dem Elutionsmuster der Gesamtmenge von AtMPK3 (Abb. 3.8).

Ein drittes Signal, das mit dem α -TpEYp-Antikörper in flg22-behandelten Zellkulturen detektiert wurde und bei dem es sich eventuell um die phosphorylierte Form von AtMPK4 handelte, war in Totalextrakten aus Blattmaterial nach Ausschlusschromatographie nicht nachweisbar. Die hier fehlgeschlagene Detektion einer dritten Bande im α -TpEYp-Immunoblot war wahrscheinlich auf biologische Variabilität und/oder technische Probleme

zurückzuführen. Einerseits schwankt die Intensität der Aktivierung der MAPKs zwischen einzelnen Experimenten und bei schwächerer Aktivierung ist dann zuerst die unterste Bande im α -TpEYp-Immunoblot nicht mehr detektierbar. Andererseits erzielt man die besten und eindeutigsten Ergebnisse bei der Immunodetektion mittels α -TpEYp-Antikörper mit möglichst frisch aufgearbeiteten Proben. Versuche wie die Ausschlusschromatographie laufen jedoch zwangsläufig über einen längeren Zeitraum.

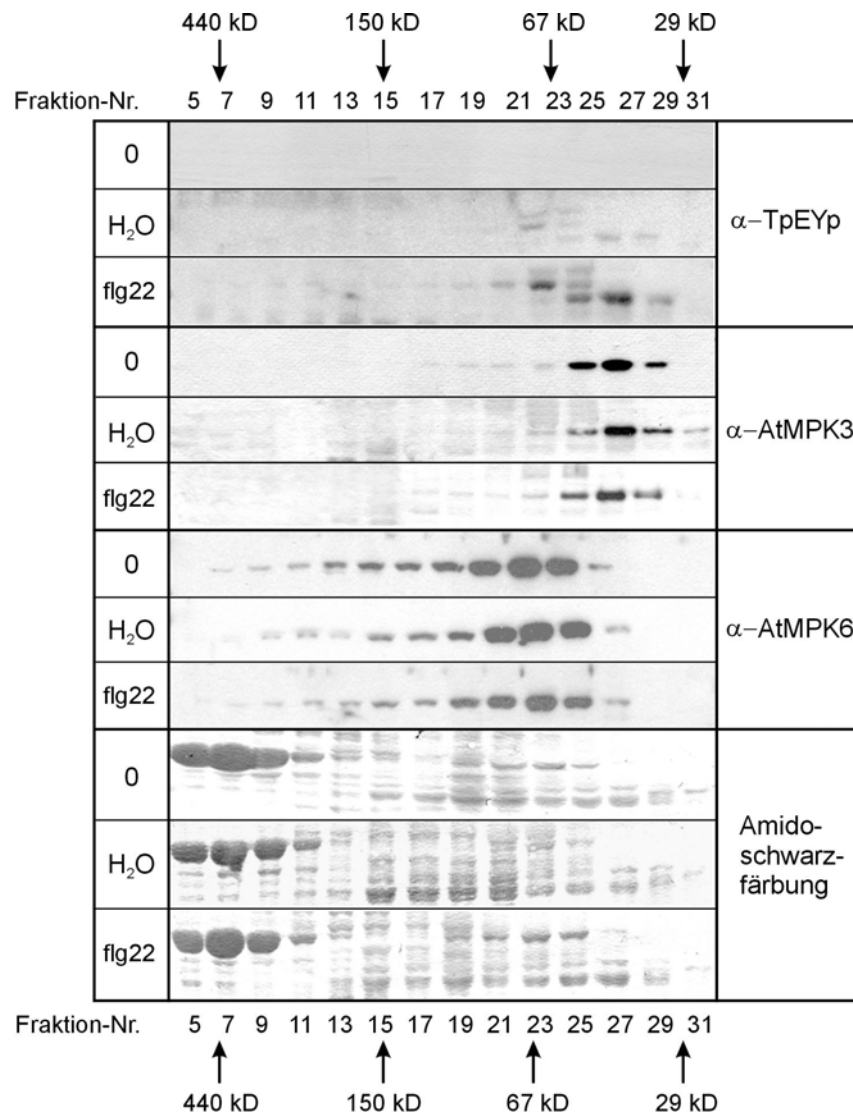


Abb. 3.8 AtMPK3 bzw. 6 sind in *Arabidopsis thaliana*-Blättern nicht bzw. nur zu einem wahrscheinlich geringen Anteil Bestandteil von Multiproteinkomplexen. Lösliche Totalextrakte von unbehandelten (0) bzw. mit Wasser oder flg22 infiltrierten Blättern sechs Wochen alter Pflanzen wurden mittels Ausschlusschromatographie über eine Superdex200 PrepGrade-Säule aufgetrennt und einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurde durch Immunoblotanalyse mit den angegebenen Antikörpern das Elutionsprofil der enzymatisch aktiven MAPKs sowie der Gesamtmenge an AtMPK3 und 6 nachgewiesen. Mit Hilfe von Amidoschwarzfärbung wurden die geladenen Proteinmengen nach der Auftrennung und der Immunoblotanalyse angefärbt.

3.2.2.3 Elutionsprofile von AtMPK3 und AtMPK6 aus NLP_{Ps}-behandelten *Arabidopsis thaliana*-Blättern

In Pflanzen kommt es als Teil einer komplexen Immunantwort nicht nur nach der Erkennung von PAMPs wie flg22, sondern auch nach Kontakt mit *Nep1-like proteins* (NLPs) zur Aktivierung von MAPKs. Global betrachtet gleichen die von NLPs ausgelösten Immunantworten denen, die durch flg22 ausgelöst werden. Das Muster der MAPK-Aktivierung nach Infiltration von NLP aus *Phytophthora parasitica* (NLP_{Pp}) in Blätter von *Arabidopsis thaliana* ähnelt dem Aktivierungsmuster, welches man nach flg22-Behandlung von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen erhält (Qutob et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein NLP aus *Phytophthora sojae* (NLP_{Ps}) in transgenen Pflanzenlinien nach Besprühen der Blätter mit Dexamethason transient überexprimiert. Durch Immunfällung gekoppelt mit einem Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass nach transienter Expression von NLP_{Ps} *in planta* AtMPK3 und 6 aktiviert werden (Abb. 3.9 B). Der Nachweis der Kinaseaktivität erfolgte dabei indirekt über die Phosphorylierung des *in vitro* Substrats MBP. Im Immunoblot mit gegen AtMPK3 gerichtetem Antikörper war außerdem ein deutlicher Anstieg der AtMPK3-Proteinmenge detektierbar (Abb. 3.9 A). Der NLP_{Ps}-induzierte Anstieg in der Proteinmenge von AtMPK3 spiegelt vermutlich den von Qutob et al. (2006) beschriebenen Anstieg der Transkriptionslevel von MPK3 nach Infiltration von NLP_{Pp} wider.

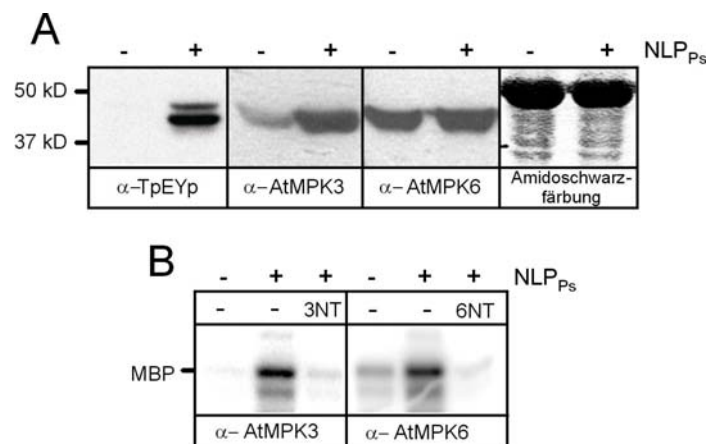


Abb. 3.9 Aktivierung von AtMPK3 und 6 durch das Protein NLP_{Ps}. In vier Wochen alten *Arabidopsis thaliana* wurde NLP_{Ps} nach Induktion durch Dexamethason transient exprimiert. Sechs Stunden später wurden alle oberirdischen Pflanzenteile geerntet. **(A)** Die Proteine wurden extrahiert und nach Auftrennung von 30 µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE einer Immunoblotanalyse mit den angegebenen Antikörpern unterzogen. Als Ladekontrolle diente die Amidoschwarzfärbung des Proteinblots. **(B)** Gezeigt ist der Nachweis der Aktivierung von AtMPK3 und 6 durch eine Immunfällung gekoppelt mit einem Kinaseaktivitätstest, bei dem das *in vitro* Substrat MBP phosphoryliert wurde. Durch Zugabe des entsprechenden Peptidpitops (3NT bzw. 6NT), gegen das der jeweilige Antikörper synthetisiert worden war, konnte die Immunfällung unterbunden und somit auch keine Kinaseaktivität nachgewiesen werden.

Totalextrakte aus NLP_{Ps}-behandeltem Blattmaterial wurden außerdem mittels Ausschlusschromatographie nativ aufgetrennt und die Elutionsprofile durch Immunoblotanalyse sichtbar gemacht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, welche durch Analyse von flg22-behandeltem Zellkultur- und Blattmaterial erhalten wurden, zeigten sich Unterschiede im Elutionsprofil von AtMPK3 in unbehandelten sowie NLP_{Ps}-behandelten Blattproben (Abb. 3.10). In unbehandeltem Blattmaterial war AtMPK3 nur in Fraktionen nachweisbar, die Proteine von der Größe der AtMPK3-Monomere enthielten. Zwar eluierte auch nach Expression von NLP_{Ps} *in planta* der größte Teil von AtMPK3 als Monomer, jedoch war bereits von Fraktion fünf an aufwärts ein Nachweis von AtMPK3 möglich. Demzufolge konnte ein Hinweis auf die Präsenz von geringen Mengen an AtMPK3 in Multiproteinkomplexen bis zu einer Größe von nahezu 500 kD erbracht werden. Möglicher Weise lag die Ursache für den Unterschied im Elutionsmuster von AtMPK3 nach NLP_{Ps}-Behandlung im Anstieg der Gesamtmenge an AtMPK3 infolge der MAP-Kinaseaktivierung.

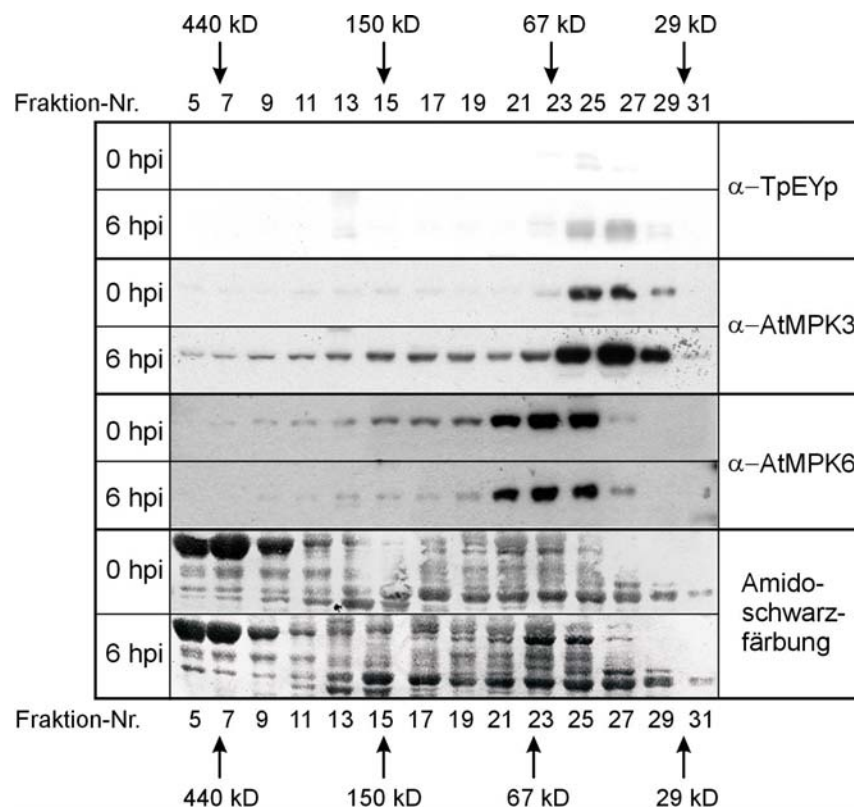


Abb. 3.10 AtMPK3 bzw. 6 sind in *Arabidopsis thaliana* Blättern nicht bzw. nur zu einem wahrscheinlich geringen Anteil Bestandteil von Multiproteinkomplexen. In vier Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde NLP_{Ps} nach Induktion durch Dexamethason transient exprimiert und sechs Stunden später (hpi) folgte die Ernte aller oberirdischen Pflanzenteile. Lösliche Totalextrakte von unbehandelten bzw. mit NLP_{Ps}-behandelten Blättern wurden mittels Ausschlusschromatographie über eine Superdex200 PrepGrade-Säule aufgetrennt und einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurde durch Immunoblotanalyse mit den angegebenen Antikörpern das Elutionsprofil der aktivierten MAPKs sowie der Gesamtmenge an AtMPK3 und 6 nachgewiesen. Mit Hilfe von Amidoschwarzfärbung wurden die geladenen Proteinmengen nach der Auftrennung und der Immunoblotanalyse angefärbt.

Wie im Fall von flg22-behandeltem Blattmaterial lag auch nach Behandlung mit NLP_{ps} der Schwerpunkt der Elution von AtMPK6 zwischen Fraktion 21 bis 25 (Abb. 3.10). Jedoch waren bereits in früher eluierenden Fraktion Spuren von AtMPK6 mittels immunologischen Methoden detektierbar. Es war daher davon auszugehen, dass der größte Teil der in Blättern vorhandenen Menge an AtMPK6 als Monomer mit einem Molekulargewicht von 45 kD vorlag.

Mit Hilfe des Antikörpers gegen das phosphorylierte TEY-Motiv konnten keine klaren Elutionsprofile für die aktivierte AtMPK3 bzw. die aktivierte AtMPK6 ermittelt werden (Abb. 3.10). Die schwachen Signale im α -TpEYp-Immunoblot deckten sich jedoch mit dem Elutionsmaximum von AtMPK3 in NLP_{ps}-behandelten Blattproben. Daher deuten diese Ergebnisse auf eine Elution von aktivierter AtMPK3 als Monomer hin.

3.3 Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* durch mehrdimensionale Trennung von Totalextrakten

Ein Kernproblem aller Proteomanalysen ist die Komplexität der Proteome und der große dynamische Bereich von schätzungsweise einem bis 10^6 Molekülen pro Protein in jeder Zelle (Rabilloud, 2002). Die Mehrheit davon sind Proteine mit niedriger bis sehr niedriger Abundanz. Eine geeignete Probenvorbereitung, welche die Komplexität des Proteoms reduziert und zu einer Anreicherung von Proteinen mit niedriger Abundanz führt, ist somit ein Schlüssel zum Erfolg einer Proteomanalyse. Von besonderem Interesse sind dabei Methoden zur Vorfraktionierung wie RP-HPLC und Ausschlusschromatographie (Sriyam et al., 2006). Es wurde deshalb nach Möglichkeiten gesucht, aufbauend auf der Vorfraktionierung der Totalextrakte mittels Ausschlusschromatographie, MAPK-interagierende Proteine aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Ergebnis dieser Überlegungen war der in Abbildung 3.11 dargestellte Ablaufplan.

Als Ausgangspunkt für die Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen wurden die unter 3.2.2.1 beschriebenen Zellextrakte betrachtet, da hier eindeutige Hinweise für die Anwesenheit von AtMPK3 und 6 in Multiproteinkomplexen gesammelt werden konnten (Abb. 3.7). Fraktionen, in denen Proteine mit einem höheren Molekulargewicht als die Monomere von AtMPK3 bzw. 6 eluierten und in denen durch Immunodetektion AtMPK3 bzw. AtMPK6 nachgewiesen werden konnte, sollten vereinigt werden. Im Anschluss an die Aufkonzentrierung der Proteine wäre es möglich, diese Proteinmischungen auf verschiedene Art und Weise weiterzuverarbeiten (Abb. 3.11). Einerseits könnten die Proteine mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und differentielle Proteine durch Massenspektrometrie analysiert werden. Andererseits bestände die Möglichkeit, die Proteingemische mit einer

Protease (z.B. Trypsin) zu verdauen. Die Komplexität der Peptidgemische könnte mittels 1D- oder 2D-nanoLC reduziert werden und die einzelnen Fraktionen könnten mit Hilfe von Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) *online* analysiert werden.

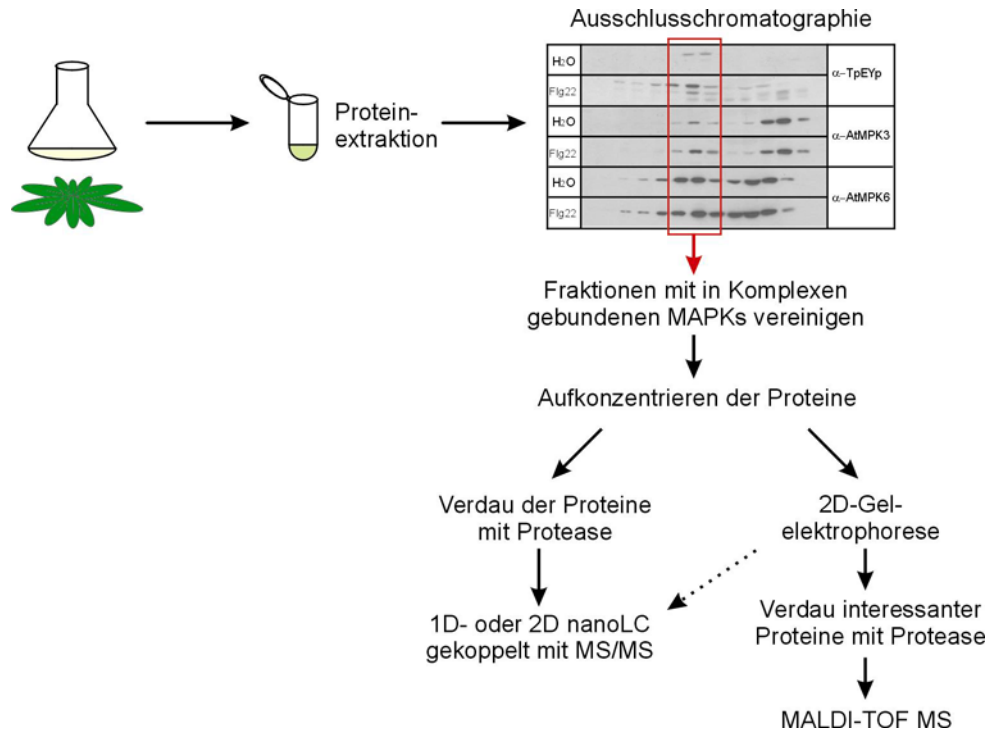


Abb. 3.11 Möglicher Arbeitsablauf zur Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* durch vergleichende Proteomanalyse von Pflanzenmaterial des Wildtyps und der *knock out*-Linien *mpk3* und *mpk6*. Nach Vorfraktionierung von aus Pflanzenmaterial extrahierten Proteingemischen könnten Fraktionen, die in Komplexen gebundene AtMPK3 bzw. AtMPK6 enthalten, durch Fällung oder Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden und auf zwei verschiedenen Wegen weiterverarbeitet werden. Nach einem Protease-Verdau der Proteine wäre es möglich, die Komplexität der Peptidgemische mittels 1D- oder 2D-nanoLC weiter zu verringern und die einzelnen Fraktionen über gekoppelte MS/MS zu analysieren. Alternativ dazu könnten die Proteinmischungen durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und MAPK-abhängig angereicherte Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Aussagen über putative Interaktoren der MAPKs 3 und 6 aus *Arabidopsis thaliana* könnten nur durch Vergleich der Protein- und proteolytischen Peptidmuster aus Wildtyp- und *knock out*-Linien (*mpk3* bzw. *mpk6*) getroffen werden. Beim Vergleich der Protein- bzw. Peptidmuster aus Wildtyp- und *knock out*-Linien sollten putative Interaktoren im Wildtypmaterial als zusätzliche Proteine oder Peptide identifizierbar sein.

Neben den komplexen technischen Anforderungen waren mit dieser Versuchsanordnung zusätzliche Bedingungen hinsichtlich der Quantität und Qualität der zur Verfügung stehenden Materialien verknüpft. Da es sich bei MAPKs um Proteine von niedriger Abundanz handelt, war davon auszugehen, dass bei der Suche nach putativen MAPK-Interaktoren die betreffenden Fraktionen aus mehreren Durchgängen der Ausschlusschromatographie vereinigt werden müssen. Deshalb sollte Material von vergleichbarer Qualität sowohl von den Wildtyp-

Linien als auch von den *knock out*-Linien der Zellkulturen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

Zwar kann heute durch den Einsatz geeigneter Nährmedien und Hormonkonzentrationen fast jede Pflanze in Kallus- oder Zellkultur gebracht werden (Zenk, 1982), jedoch zeigt die Praxis im Labor, dass nicht alle Zellsuspensionskulturen durch Subkultivierung stabil erhalten werden können. So zeigten die aus *mpk3*- bzw. *mpk6*-Keimlingen erzeugten Zellkulturen im Vergleich zu den vorhandenen, etablierten Zellkulturen aus Col (Wt) bzw. Ler (Wt) ein geringeres Wachstum und enthielten große Mengen an Zelltrümmern. Ferner wurden bereits bei der eindimensionalen Auftrennung von Proteintotalextrakten im SDS-Polyacrylamidgel deutliche Unterschiede im Proteinmuster sichtbar (Abb. 3.12 A). Unter Berücksichtigung der generellen Probleme bei der Erzeugung von stabilen Zellkulturen aus *mpk3*- und *mpk6*-Keimlingen müssen die gezeigten Unterschiede im Proteinmuster zwischen Wildtyp und *knock out* keine Folge der fehlenden Expression von AtMPK3 bzw. 6 sein.

Das ideale System für die vergleichende Proteomanalyse zwischen Wildtyp und *knock out* unterscheidet sich auf Proteinebene nur bezüglich des ausgeschalteten Proteins. Treten sehr große Unterschiede in der Zusammensetzung des Proteoms von Wildtyp- und *knock out*-Linien bereits im ungestressten Zellkultur- bzw. Blattmaterial auf, führt eine vergleichende Analyse der Proteome zu keinem spezifischen Ergebnis. Es wurde daher entschieden, die Suche nach putativen MAPK-Interaktoren in Zellkulturmaterial basierend auf Differenzen in der Zusammensetzung der Proteingemische in Abhängigkeit von der Anwesenheit der AtMPK3 und 6 nicht weiter zu verfolgen.

Nach eindimensionaler Auftrennung von Proteinen, die aus Blattmaterial des Wildtyps und der *knock-out*-Linien von AtMPK3 bzw. 6 extrahiert wurden, zeigten sich im silbergefärbten SDS-Gel keine detektierbaren Unterschiede im Bandenmuster (Abb. 3.12 B). Die Zusammensetzung des Proteinextraktes in den Blättern der *knock-out*-Linien ähnelte demzufolge dem in Wildtyp-Blättern vorhandenen Proteingemisch. Die Ähnlichkeit der Proteinextrakte aus Blattmaterial von Wildtyp und *knock outs* im eindimensionalen Proteingel ist eine gute Voraussetzung für eine vergleichende Proteomanalyse zur Identifizierung von putativen AtMPK3- und AtMPK6-Interaktoren.

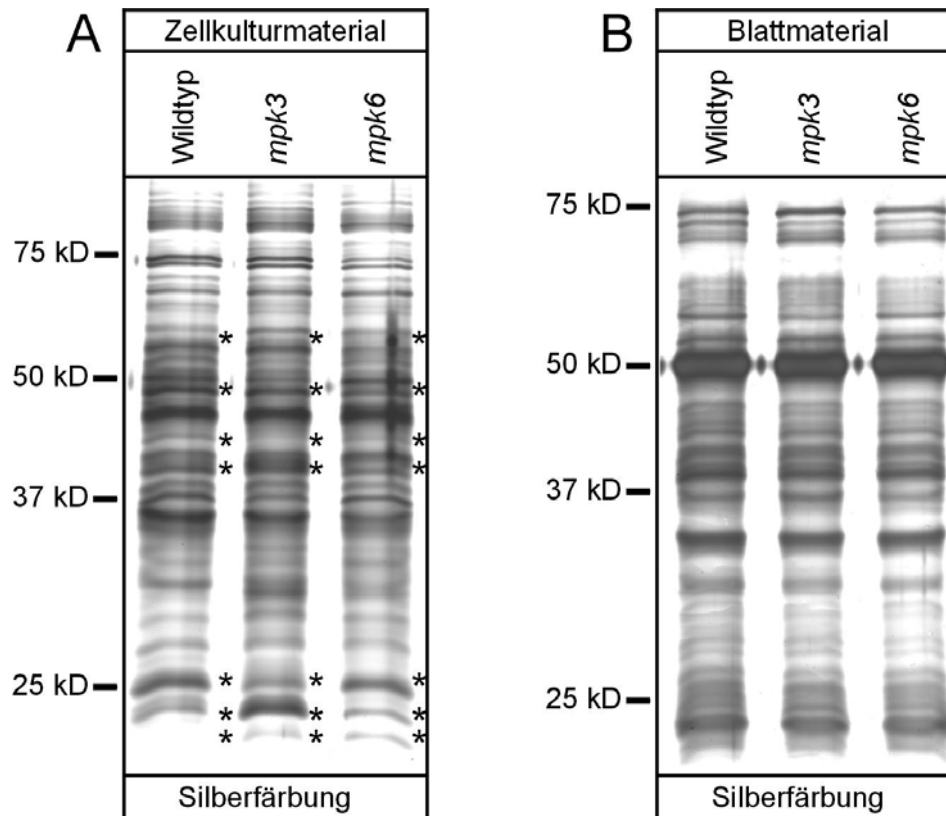


Abb. 3.12 Vergleichende Analyse von Proteinen aus Totalextrakten der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia. **(A)** Gegenüberstellung von Proteinextrakten aus Wildtyp- und *knock out*-Zellkulturen. In der eindimensionalen Auftrennung von 2 µg Gesamtprotein im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel zeigten sich nach der Silberfärbung deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Proteoms der Wildtyp- und *knock out*-Zellkulturen. Die Abweichungen im Bandenmuster wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet **(B)** Gegenüberstellung von Proteinextrakten aus Wildtyp- und *knock out*-Blättern. Nach der eindimensionalen Auftrennung von 2 µg Gesamtprotein im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel waren die nach Silberfärbung sichtbar gewordenen Bandenmuster nahezu identisch.

Nachteilig auf einen Erfolg des in Abbildung 3.11 beschriebenen Experimentes würden sich allerdings folgende Tatsachen auswirken: (i) Im Blattmaterial konnte mittels Ausschlußchromatographie und Immunodetektion entweder keine oder nur schwache Hinweise auf eine Beteiligung von AtMPK3 bzw. AtMPK6 an der Bildung von Multiproteinkomplexen erbracht werden. (ii) Der geringe Anteil von AtMPK6, der in höhermolekularen Komplexen detektiert wurde, eluiert nicht begrenzt auf wenige Fraktionen, sondern über viele Fraktionen hinweg verteilt. (iii) Wie in den Abbildungen 3.3 B und 3.5 B gezeigt, enthielten Extrakte aus Blattmaterial im Verhältnis zur Menge des Gesamtproteins weniger AtMPK3- bzw. AtMPK6-Protein als Extrakte aus Zellkulturmaterial. Somit wäre die zu erwartende Ausbeute von putativen MAPK-Interaktoren sehr gering.

3.4 Isolierung von MAPK-interagierenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* mittels Tandemaffinitätsreinigung

Einerseits ist die zelluläre Konzentration von an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen sehr gering. Bei einigen Rezeptoren bzw. Transkriptionsfaktoren aus menschlichen Zellen wird davon ausgegangen, dass diese wahrscheinlich in jeder Zelle nur zu je 100 bis 1000 Molekülen vorliegen. Im Vergleich dazu enthält eine durchschnittliche menschliche Zelle Schätzungen zufolge etwa 10^8 Moleküle des Filamente-bildenden Actins (Rabilloud, 2002). Andererseits ist zur Identifizierung von mit MAPKs assoziierten Proteinen eine möglichst spezifische Aufreinigung von AtMPK3 bzw. 6 und ihren Interaktoren unabdingbar. Die Auswahl eines geeigneten Proteintrennverfahrens und dessen Optimierung war daher eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit. Im Zuge der Optimierung von Proteintrennverfahren stellt die Einführung der Tandemaffinitätsreinigung nach Rigaut et al. eine wesentliche Verbesserung dar. Die TAP-Methode erlaubt eine native Aufreinigung von TAP-markierten Proteinen in zwei Schritten (Rigaut et al., 1999; Gavin et al., 2002). Da auf diese Weise der Reinigungsgrad der Zielproteine aus komplexen Proteinmischungen deutlich gesteigert werden kann, eignet sich diese Methode besonders für die Aufreinigung von niedrig exprimierten Zielproteinen.

In einer Hochdurchsatzanalyse zur Charakterisierung von *Saccharomyces cerevisiae* Proteinkomplexen konnten mittels TAP-Technologie 232 Multiproteinkomplexe isoliert und ihre Bestandteile identifiziert werden (Gavin et al., 2002). Allerdings verwiesen die Autoren dieser Studie auf Limitationen bezüglich der Nachweisbarkeit von transienten Interaktionen, Komplexen mit geringer Stöchiometrie und/oder jenen Interaktionen, die einen spezifischen physiologischen Status erfordern. Da in Bezug auf MAPKs alle Limitationen mehr oder weniger vorhanden sind, können mit Hilfe der TAP-Technologie mit Sicherheit nie alle MAPK-Interaktoren isoliert und identifiziert werden. Jedoch gibt es wahrscheinlich keine Methode, mit der alle Protein-Protein-Interaktionen, die in einem Organismus vorliegen, erschöpfend nachweisbar sind.

MAPKs gehen sowohl als Substrate für MAP2Ks (Fujioka et al., 2006) und MAPK-Phosphatasen (Farooq and Zhou, 2004) als auch in ihrer Funktion als Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren (Waas and Dalby, 2002) kurzzeitige Enzym-Substrat-Interaktionen ein. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene Isoformen der MAPK JNK stabile Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren eingehen können (Gupta et al., 1996). Außerdem konnten im Rahmen dieser Arbeit bereits Hinweise erbracht werden, dass AtMPK3 und 6 in unterschiedlichem Ausmaß Teil von Multiproteinkomplexen sind. Ob die Anzahl der Proteinkomplexe, welche AtMPK3 und 6 enthalten, unter der für die TAP-Technologie

existierenden Nachweisgrenze liegt, war nicht vorhersagbar. Überdies sind Coimmunfällungen von MAPKs und ihren Interaktoren möglich (Luttrell et al., 2001; Bardwell and Shah, 2006; Zheng et al., 2006).

Dass Proteinkomplexe, welche an Signalgebungsprozessen beteiligt sind, mit Hilfe der TAP-Technologie isolierbar und identifizierbar sind, zeigte jedoch bereits die Hochdurchsatzanalyse von Gavin et al. (2002). Durch TAP-Aufreinigung von verschiedenen Komponenten der Proteinphosphatase 2A (PP2A) aus *Saccharomyces cerevisiae* war es möglich, bekannte trimere Komplexe von PP2A nachzuweisen. Des Weiteren gelang in dieser Studie die Bestätigung der Interaktion der Kinase SNF1 mit ihrer aktivierenden Kinase PAK1.

Mittlerweile konnte mit Hilfe der TAP-Technologie auch ein Substrat für eine MAPK aus *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden. Um den Fortschritt des Zellzyklus mit der Zellwandintegrität koppeln zu können, muss die MAPK SLT2 mit KNR4 interagieren (Martin-Yken et al., 2003; Basmaji et al., 2006).

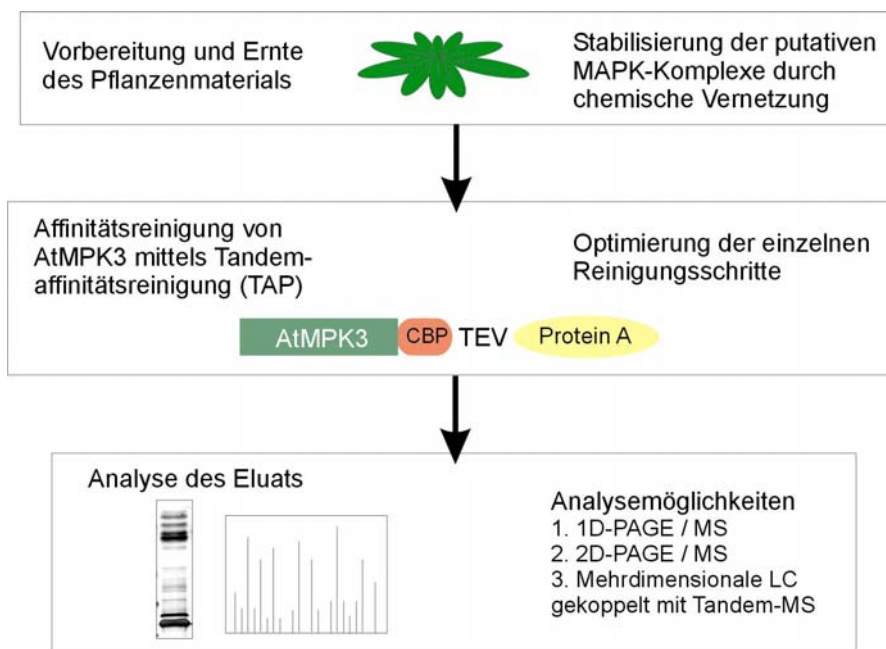


Abb. 3.13 Arbeitsablauf zur Optimierung der Isolierung und Identifizierung von mit AtMPK3 assoziierten Proteinen. In einem ersten Schritt sollte die Möglichkeit der Stabilisierung von putativen MAPK-Komplexen durch chemische Vernetzung getestet werden. Als nächstes war die Tandemaffinitätsreinigung für C-terminal TAP-markierte AtMPK3 zu optimieren. Die TAP-Markierung setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden IgG-Bindedomänen von Protein A, einer Schnittstelle der TEV-Protease, sowie einer Calmodulin-Bindedomäne (CBP) zusammen. Am Ende galt es, verschiedene Analysemöglichkeiten für das TAP-Eluat zu vergleichen.

In *Oryza sativa* wurden 41 cDNAs von verschiedenen Kinasen mit der TAP-Markierung fusioniert und anschließend konnten 23 verschiedene Proteinkomplexe nachgewiesen werden (Rohila et al., 2006). Dabei gelang auch die Isolierung und Identifizierung von Proteinen, die wahrscheinlich mit der MAP2K1 bzw. mit der Proteinkinase Os10g37480 assoziiert waren. Bei der Proteinkinase Os10g37380 handelt es sich vermutlich um eine MAP2K oder MAP3K. Die Optimierung der TAP-Reinigung zur Isolierung und Identifizierung von MAPK-Interaktoren für AtMPK3 und 6 war mit großem experimentellen Aufwand verbunden. Infolgedessen wurden AtMPK3 und 6 in zwei verschiedenen Dissertationen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus im Folgenden auf AtMPK3. Der Arbeitsablauf, welcher die Grundlage für die Optimierung der TAP-Aufreinigung von AtMPK3 bildete, gliederte sich in die drei Schwerpunkte Probenvorbereitung, Aufreinigung der TAP-markierten Proteine und Analyse der TAP-Eluat (Abb. 3.13).

3.4.1 Suche nach Möglichkeiten zur Stabilisierung von eventuell instabilen Proteinkomplexen

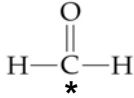
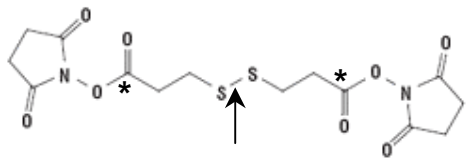
Bei Interaktionen von Enzymen der Signalmaschinerie der Zelle mit ihren Substraten oder Aktivatoren liegen oft schwache Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern vor. So ließen sich durch die hier durchgeführte Ausschlusschromatographie wahrscheinlich nur stabilere AtMPK3- bzw. AtMPK6-Komplexe nachweisen, da instabile Komplexe während der Probenaufbereitung und bis zum Abschluss der Analyse zerfielen.

Instabile Proteinkomplexe können durch intermolekulare chemische Vernetzung (*crosslinking*) gefestigt werden, wenn die dafür benötigten Aminosäurereste in den interagierenden Proteinen sich in ausreichender räumlicher Nähe zueinander befinden. Auf diese Weise war man bereits in der Lage, die Formation eines β -Arrestin-abhängigen Gerüstkomplexes mit Hilfe von Ausschlusschromatographie zu dokumentieren (DeFea et al., 2000). Das Protein β -Arrestin ist Bestandteil eines Gerüstkomplexes, der die Aktivierung und subzelluläre Lokalisierung der MAPKs ERK1 und 2 beeinflusst. In Verbindung mit der Tandemaffinitätsreinigung von Proteinen aus Pflanzenmaterial gelang außerdem eine Erhöhung der Rückgewinnung von interagierenden Proteinen nach chemischer Vernetzung mit Formaldehyd (Rohila et al., 2004). Aufbauend auf diese Studien wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Probenvorbereitung mittels *crosslinking* zu optimieren.

Bei der Auswahl der Substanzen für die chemische Vernetzung waren folgende Parameter zu beachten: (i) Um die chemische Vernetzung *in vivo* durchführen zu können, mussten die verwendeten *crosslinker* membranpermeabel sein. (ii) Da isolierte Komplexe nach der Affinitätsreinigung mit Hilfe der TAP-Markierung durch massen-

spektrometrische Methoden analysiert werden, sollten spaltbare chemische Vernetzer eingesetzt werden. Daher fiel die Wahl auf Formaldehyd (HCHO) sowie 2,2'-Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP). Die Struktur dieser Substanzen sowie die Bedingungen für die Spaltung sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1 Beschreibung der für die chemische Vernetzung benutzten Substanzen HCHO und DSP. Die für das *crosslinking* wichtigen reaktiven Zentren der Moleküle sind mit einem * gekennzeichnet. Der Mechanismus der Spaltung des HCHO-induzierten *crosslinkings* wurde bisher nicht untersucht (Kunkel et al., 1981). Der Ort, an dem DSP gespalten werden kann, ist mit einem ↑ markiert.

Name und Struktur der zur chemischen Vernetzung verwendeten Substanz	
Formaldehyd HCHO 	2, 2'-Dithiobis(succinimidylpropionat) DSP 
Maximal überbrückbare Distanz	
2 Å (= 0,2 nm)	12 Å (= 1,2 nm)
Bedingungen für die Spaltung	
(1) Inkubation bei niedrigem pH-Wert und unter spezifischen, hoch denaturierenden Bedingungen wie 8 M Harnstoff (Orlando, 2000) (2) Erhitzen auf 95°C in 2 M Guanidinium-HCl und 0,5 M β-Mercaptoethanol (Kunkel et al., 1981)	(1) Inkubation mit 10 bis 50 mM DTT für 30 min bei 37°C (2) Inkubation mit 5% β-Mercaptoethanol für 5 min bei 95°C nach Protokoll von PIERCE (IL, USA)

Formaldehyd ist eine hochreaktive Substanz, die sowohl Protein-Protein-*Crosslinking* als auch Protein-Nukleinsäure-*Crosslinking* induziert. Über den Mechanismus des HCHO-induzierten Protein-Protein-*Crosslinkings* ist wenig bekannt (Kunkel et al., 1981). Wahrscheinlich kommt es zur Bildung von Heteroaddukten, in denen Lysin einen Partner darstellt. Modellstudien suggerieren, dass die aktivierten Lysinmoleküle anschließend mit benachbarten Glutamin-, Asparagin-, Tryptophan-, Histidin-, Arginin-, Cystein- oder Tyrosinresten reagieren (Kunkel et al., 1981). Der NHS-Ester DSP vernetzt Proteine nur durch Reaktionen mit der Aminogruppe des Lysins (Pierce, IL, USA). Demzufolge wurde in dieser Arbeit der hochreaktive, aber wenig selektive *crosslinker* HCHO im Vergleich zum weniger reaktiven, aber selektiveren *crosslinker* DSP getestet.

Einen deutlichen Unterschied findet man auch bei der räumlichen Distanz, die maximal durch HCHO bzw. DSP überbrückt werden kann. Eine chemische Vernetzung mit HCHO erfolgt über eine aus einem Atom bestehende Brücke und somit über einen sehr geringen Abstand von

maximal 0,2 nm (2 Å) (Orlando, 2000). Im Gegensatz dazu lassen sich mit DSP Distanzen von bis zu 1,2 nm (12 Å, Pierce) überbrücken. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Ausdehnung von konventionellen Proteinen in einer Größenordnung zwischen 2 und 6 nm (20 und 60 Å) bewegt (Bhat et al., 2006).

Da keine AtMPK3-TAP-exprimierenden Zellkulturen zur Verfügung standen, sollte für die Aufreinigung von putativen AtMPK3-Interaktoren Blattmaterial verwendet werden. Folglich stellte sich die Frage nach einer für *crosslinker* geeigneten Applikationsmethode. Um große Mengen an mit HCHO- bzw. DSP-behandeltem Blattmaterial in kurzer Zeit erhalten zu können, wurden für die Applikation Vakuuminfiltration, Flottieren und Sprühen getestet. Prinzipiell kann Pflanzenmaterial länger in DSP-haltigen Lösungen als in HCHO-haltigen Lösungen inkubiert werden, da DSP in den für das chemische Vernetzen eingesetzten Konzentrationen nicht letal wirkt.

Aussagen über die Effizienz der chemischen Vernetzung von Proteinkomplexen aus Blattmaterial erfolgten anhand verschiedener Analysemethoden (Abb. 3.14 und 3.15). Zunächst wurden Totalextrakte mit Hilfe von denaturierender bzw. nativer Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Silber- oder Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Anhand der Färbung der Proteine konnte anschließend die chemische Vernetzung von abundanten Proteinen bzw. Proteinkomplexen beurteilt werden. Im Falle von Formaldehyd zeigten sich unabhängig von der Applikationsmethode deutliche Änderungen im Trennmuster der Totalextrakte (Abb. 3.14). Tendenziell stieg die Anzahl an Proteinkomplexen mit hohem Molekulargewicht bei gleichzeitiger Reduktion der Zahl von Proteinen bzw. Proteinkomplexen mit niedrigerem Molekulargewicht. Dies deutet auf eine generelle Stabilisierung von abundanten, höhermolekularen, proteinhaltigen Komplexen nach HCHO-Behandlung hin. Es ist davon auszugehen, dass durch die Behandlung mit HCHO gleichzeitig auch Protein-Nukleinsäure-Interaktionen stabilisiert wurden. Dadurch kam es zu einer weiteren Reduktion der Anzahl an abundanten Proteinen mit einem niedrigeren Molekulargewicht. Außerdem führte das Flottieren der Blätter in Formaldehyd-Lösung zu einer übermäßig starken chemischen Vernetzung der Proteine, da abundante Proteine nach nativer Gelelektrophorese und Coomassiefärbung nicht mehr nachweisbar waren.

Im Anschluss an die Behandlung mit DSP wurden hingegen weder nach denaturierender noch nach nativer Gelelektrophorese Unterschiede im Trennmuster von Totalextrakten gefunden (Abb. 3.15). Es erfolgte offenbar keine detektierbare chemische Vernetzung von abundanten Proteinen. Da DSP jedoch schon mehrfach erfolgreich für *in vivo crosslinking* in tierischen Zellen eingesetzt wurde (Joshi and Burrows, 1990; Kim and Sheffery, 1990; DeFea et al., 2000), konnte ein generelles Problem mit der chemischen Vernetzung nahezu ausgeschlossen

werden. Naheliegender ist die Tatsache, dass DSP nicht in der Lage war in die einzelnen Zellen des Blattgewebes vorzudringen, da das Blattgewebe zu komplex ist und/oder die Zellwand nicht von ausreichend DSP-Molekülen durchdrungen werden konnte.

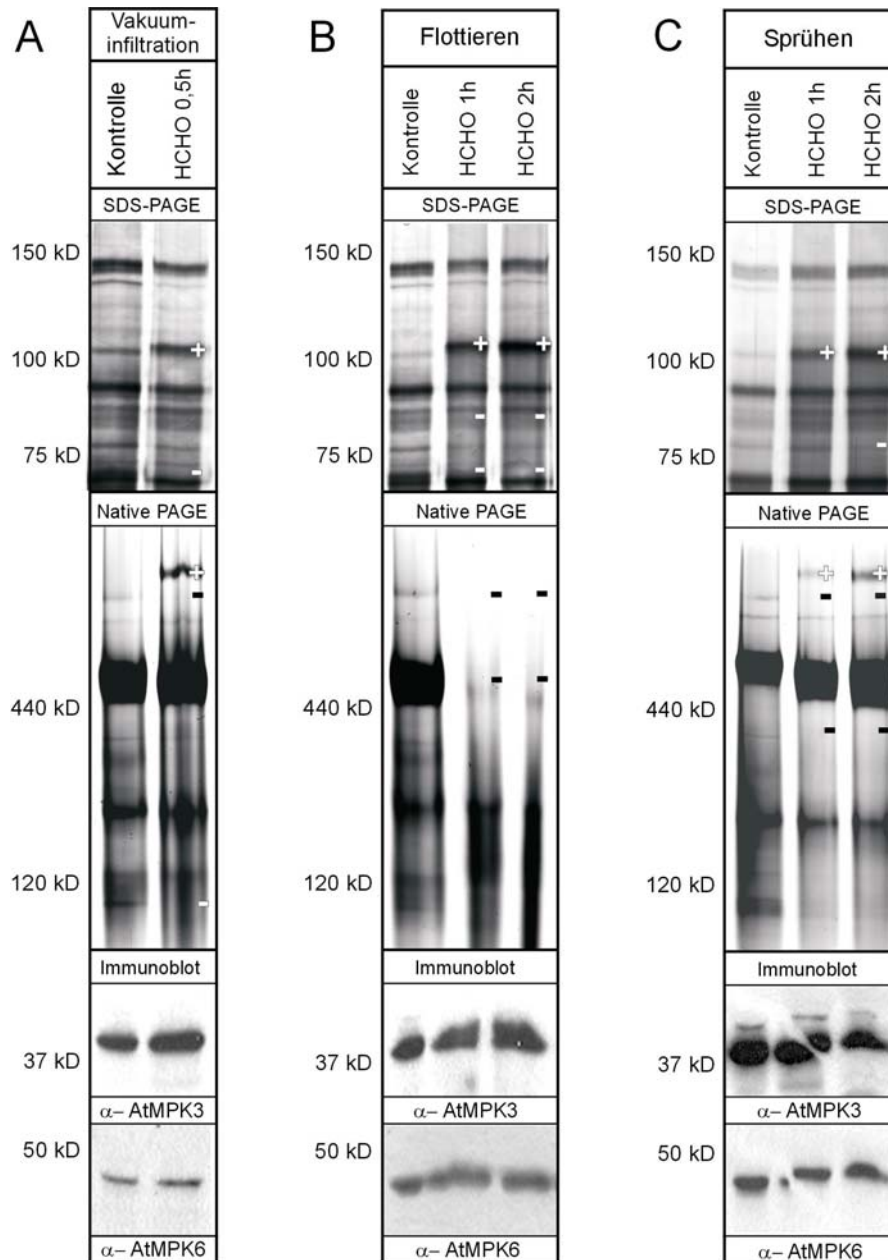


Abb. 3.14 Applikation von HCHO auf *Arabidopsis thaliana* mittels Vakuuminfiltration (A), Flottieren (B) und Sprühen (C). Um Aussagen über die Effizienz der chemischen Vernetzung treffen zu können, wurde das entsprechende Blattmaterial mit Hilfe von denaturierender und nativer Gelelektrophorese sowie Immunoblotanalyse untersucht. Unabhängig von der Applikationsmethode konnten für die Behandlung mit HCHO Hinweise auf eine chemische Vernetzung von abundanten Proteinen bzw. Proteinkomplexen erhalten werden. Im HCHO-behandelten Probenmaterial wurde das Verschwinden einer Proteinbande im Vergleich zur Kontrolle mit einem Minus gekennzeichnet. Kamen im Vergleich zur Kontrolle hingegen Proteinbanden hinzu, erfolgte die Kennzeichnung mit einem Plus. Es gelang nicht, eine chemische Vernetzung von AtMPK3 und 6 nachzuweisen.

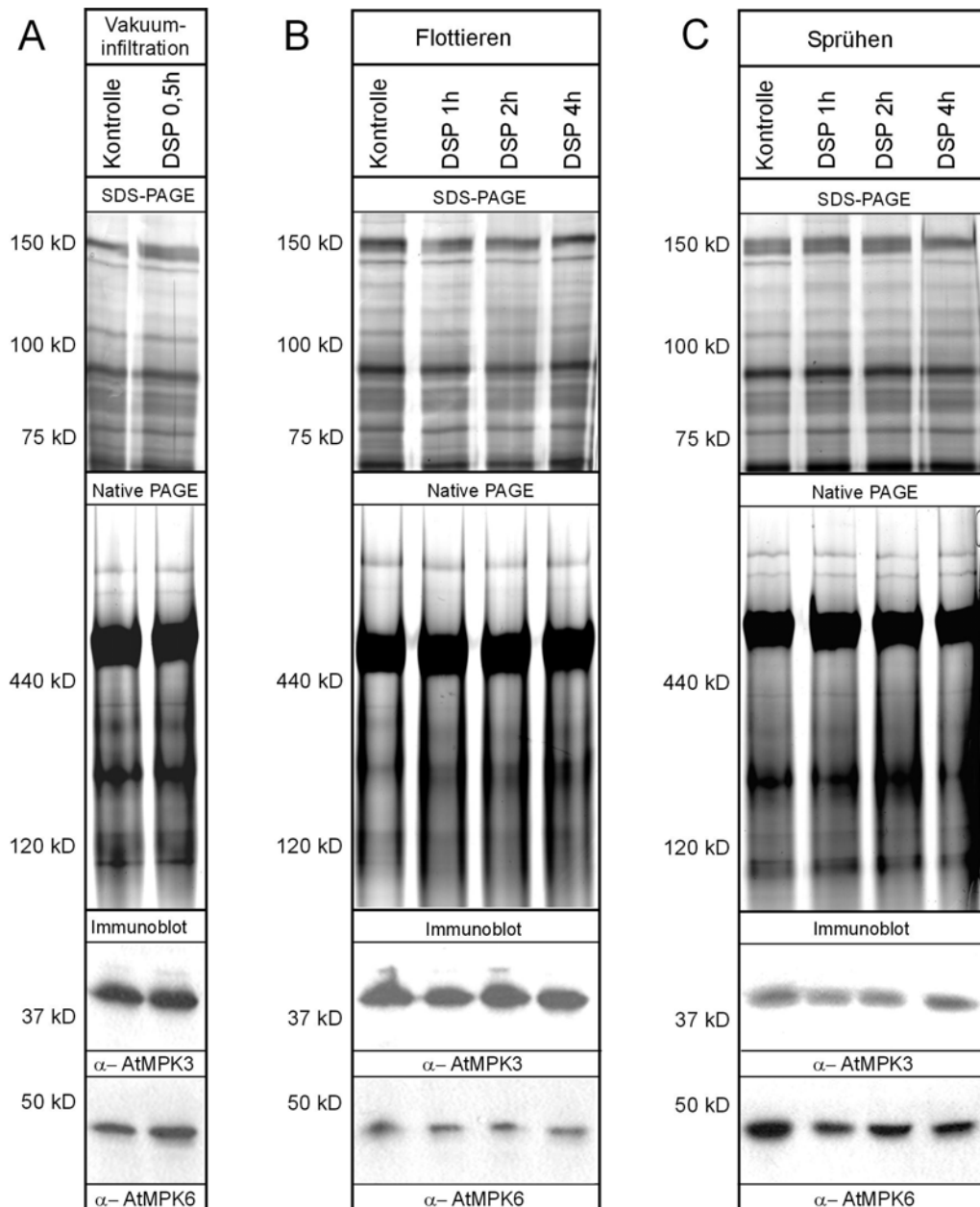


Abb. 3.15 Applikation von DSP auf *Arabidopsis thaliana* mittels Vakuuminfiltration (**A**), Flottieren (**B**) und Sprühen (**C**). Um Aussagen über die Effizienz der chemischen Vernetzung treffen zu können, wurde das entsprechende Blattmaterial mit Hilfe von denaturierender und nativer Gelelektrophorese sowie Immunoblotanalyse untersucht. Im Falle einer Applikation von DSP konnten weder für abundante Proteine bzw. Proteinkomplexe noch für AtMPK3 und 6 Hinweise auf eine chemische Vernetzung detektiert werden.

Parallel zur Analyse der Totalextrakte mittels Gelelektrophorese und Färbung der Proteine wurde auch der Einfluss der Applikation von HCHO und DSP auf die Menge an AtMPK3- bzw. AtMPK6-Monomeren im Blattmaterial untersucht. Nach der denaturierenden Gelelektrophorese und anschließender Immunoblotanalyse mit den entsprechenden Antikörpern konnte jedoch in beiden Fällen keine Reduktion der Menge der vorhandenen AtMPK3- bzw. AtMPK6-Monomere verzeichnet werden. Es war demzufolge nicht möglich, die

Probenvorbereitung für die TAP-Aufreinigung von AtMPK3 mit Hilfe von chemischer Vernetzung zu optimieren.

3.4.2 Isolierung von TAP-markierter AtMPK3 und mit ihr assoziierter Proteine

3.4.2.1 Auswahl geeigneter transgener Pflanzenlinien

Bei der Tandemaffinitätsreinigung nach Rigaut et al. (1999) werden die Zielproteine mit einer TAP-Markierung fusioniert, die aus zwei aufeinanderfolgenden IgG-Bindedomänen von Protein A, einer Schnittstelle der TEV-Protease, sowie einer Calmodulin-Bindedomäne besteht (Abb. 3.16 A). In Vorbereitung auf diese Arbeit war AtMPK3 C-terminal mit dem TAP-Tag markiert und mit Hilfe von *Agrobacterium* in das Genom von *mpk3-knock outs* inseriert worden. Hier konnte durch Immunoblotanalyse gezeigt werden, dass unter endogenem Promotor exprimierte AtMPK3-TAP in etwas geringerer Menge vorhanden war als Wildtyp AtMPK3 (Abb. 3.16 B). Eine Überexpression von AtMPK3-TAP durch Verwendung des 35S-Promoters war nicht möglich, da im Vergleich die höchste Expression von 35S-AtMPK3-TAP niedriger war als die Expression von AtMPK3 im Wildtyp (Abb. 3.16 B).

Da die eindeutigsten Hinweise für eine Beteiligung von AtMPK3 an der Bildung von Proteinkomplexen von *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen stammen, wurde eine Expression von AtMPK3-TAP in Zellkulturen angestrebt. Zunächst wurde versucht, aus den AtMPK3-TAP exprimierenden Pflanzenlinien Kalli zu erzeugen, welche als Basis für die Etablierung von Zellsuspensionskulturen dienen sollten. Diese Versuche schlugen fehl. Später gelang die Transformation von Wildtyp-Suspensionskulturen mit AtMPK3-TAP. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese transgenen Zellkulturlinien aus Zeitgründen nicht mehr näher analysiert werden.

Im Gegensatz zu den gängigen Peptidepitopen wie HA und FLAG handelt es sich beim TAP-Tag um eine Markierung mit einem vergleichsweise hohen Molekulargewicht von etwa 20 kD. Da sich bereits die Epitop-Markierung von Proteinen negativ auf deren Aktivität auswirken kann, galt es in Vorbereitung auf die TAP-Reinigung nicht nur transgene Pflanzenlinien mit einer dem Wildtyp ähnlichen Expression der modifizierten AtMPK3 auszuwählen, sondern auch die Aktivierbarkeit von AtMPK3-TAP zu überprüfen. Dazu wurde eine 10 µM wässrige flg22-Lösung möglichst großflächig in die Blattunterseite infiltriert. Da durch die Infiltration prinzipiell Verwundungsreaktionen wie die Aktivierung von MAPKs angeschaltet werden, wurde parallel zur flg22-Infiltration eine Wasserkontrolle mitgeführt. Im Anschluss an eine Immunfällung mit an Sepharose gebundenem IgG erfolgte die Detektion der Kinaseaktivität durch Phosphorylierung des *in vitro* Substrats MBP. Wie aus Abbildung 3.16 C ersichtlich

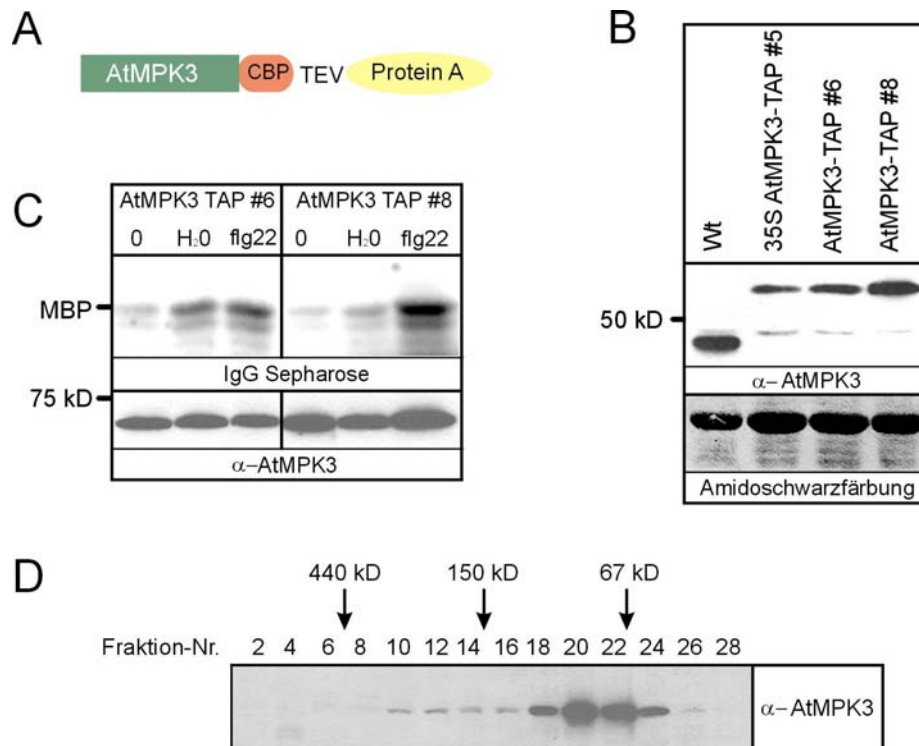


Abb. 3.16 Expression und Funktionalität von TAP-markierter AtMPK3. **(A)** Schematische Darstellung der TAP-markierten AtMPK3 (CBP = *calmodulin binding protein*; TEV = Schnittstelle für TEV-Protease). **(B)** Vergleich der Proteinmenge von Wildtyp-AtMPK3 mit AtMPK3-TAP aus unbehandelter *Arabidopsis thaliana*. Die Expression von AtMPK3-TAP erfolgte sowohl unter dem 35S-Promoter als auch unter dem endogenen Promoter. Es konnte keine Überexpression von AtMPK3-TAP nachgewiesen werden. **(C)** Untersuchung der Kinaseaktivität von AtMPK3-TAP durch Immunfällung gekoppelt mit einer *in vitro*-Phosphorylierung von MBP durch die aktive AtMPK3-TAP. **(D)** AtMPK3-TAP ist in unbehandelten Blättern von *Arabidopsis thaliana* wahrscheinlich in geringem Umfang Bestandteil von Multiproteinkomplexen. Lösliche Totalextrakte von Blättern fünf Wochen alter Pflanzen wurden mittels Ausschlusschromatographie über eine Superdex200 PrepGrade-Säule aufgetrennt und einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurde durch Immunoblotanalyse mit α -AtMPK3-Antikörper das Elutionsprofil von AtMPK3-TAP nachgewiesen.

wird, war es möglich, die TAP-markierte AtMPK3 durch Verwundung (Wasserkontrolle) bzw. Infiltration von flg22 zu aktivieren.

In einem letzten Schritt vor der Optimierung der Tandemaffinitätsreinigung für AtMPK3 wurden Totalextrakte aus AtMPK3-TAP exprimierenden transgenen *Arabidopsis thaliana*-Linien nativ mittels Ausschlusschromatographie aufgetrennt und das Elutionsprofil durch Immunoblotanalyse ermittelt (Abb. 3.16 D). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass zumindest ein kleiner Anteil an AtMPK3-TAP in höhermolekularen Fraktionen (Fraktion 10 bis 16) eluierte. Auf Grund dieses ungünstigen stöchiometrischen Verhältnis von AtMPK3-TAP in monomerer Form zu AtMPK3-TAP als Teil von Proteinkomplexen war es erforderlich, für die TAP-Reinigung große Mengen an Pflanzenmaterial zu verwenden. In Zahlen ausgedrückt wurde für eine TAP-Aufreinigung im großen Maßstab, wie sie in Abbildung 3.23 gezeigt ist, 90 g Pflanzenmaterial verwendet und somit 90mal mehr Material als bei der Ausschlusschromatographie.

3.4.2.2 Optimierung der Tandemaffinitätsreinigung für TAP-markierte AtMPK3

Die Reinigung beginnt mit einer Affinitätschromatographie an einer IgG-Matrix, gefolgt von der Abspaltung des gebundenen Proteins durch die TEV-Protease. Nach einem zweiten Affinitätsschritt an einer Calmodulin-haltigen Matrix werden gebundene Proteine durch Zugabe von EGTA eluiert (Rigaut et al., 1999; Puig et al., 2001) (Abb. 3.17). Entsprechend der zunehmenden Verbreitung der Tandemaffinitätsreinigung existieren eine Vielzahl von Variationen bezüglich der Dauer der einzelnen Bindungsschritte sowie der Temperatur, bei welcher der Verdau mit der TEV-Protease stattfindet. Da AtMPK3 als Teilstück einer Signaltransduktionskette wahrscheinlich teilweise an der Bildung von Proteinkomplexen mit schwachen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bindungspartnern beteiligt ist, sollte die Reinigung von AtMPK3-TAP schnellstmöglich und unter Vermeidung von Temperaturschwankungen und hohen Temperaturen stattfinden. Nach der Durchführung von Vorversuchen für die einzelnen Reinigungsschritte wurden die in Abbildung 3.17 aufgeführten Bedingungen für die vollständige Affinitätsreinigung angewandt. Bis auf den letzten Elutionsschritt erfolgte die komplette Aufreinigung inklusive der Handhabung zwischen den einzelnen Reinigungsschritten bei 4°C. Da beim letzten Schritt eine möglichst vollständige Elution der modifizierten AtMPK3 erreicht werden sollte und sich ein Zerfall von eventuell bestehenden AtMPK3-Komplexen nicht mehr negativ auf das Ergebnis auswirken konnte, wurde die Elution bei 15°C durchgeführt.

Für die Optimierung der TAP-Methode stand allein das Zielprotein AtMPK3 im Vordergrund. Deshalb kam bei allen hier durchgeführten partiellen und vollständigen Aufreinigungen nur unbehandeltes AtMPK3-TAP-Blattmaterial zum Einsatz. Es erfolgten noch keine Vergleiche von AtMPK3-Aufreinigungen aus Blattmaterial, welches einen unterschiedlichen physiologischen Status aufwies.

Von enormer Bedeutung für Proteinreinigungen aller Art ist die Überwachung der Tauglichkeit der jeweiligen Aufreinigung in Bezug auf das Zielprotein. Im vorliegenden Fall erfolgte die Untersuchung der Reinigungsprozedur mit Hilfe von Immunoblotanalyse der einzelnen bei den jeweiligen Reinigungsschritten genommenen Aliquots. Abbildung 3.18 zeigt eine komplette Aufreinigung von AtMPK3-TAP ausgehend von 15 g feingemörsertem Blattmaterial oder, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge, 70 mg Gesamtprotein. Die Bindung von AtMPK3-TAP an die IgG-Sepharose erfolgte mit hoher Effizienz. Im Gegensatz dazu konnte im Eluat nach dem AcTEVTM-Verdau (1. Eluat) nur noch sehr wenig modifizierte AtMPK3 detektiert werden, obwohl vom Eluat fünfmal mehr geladen wurde als von der an die IgG-Sepharose gebundenen AtMPK3-TAP (Abb. 3.18). An dieser Stelle sollte allerdings berücksichtigt

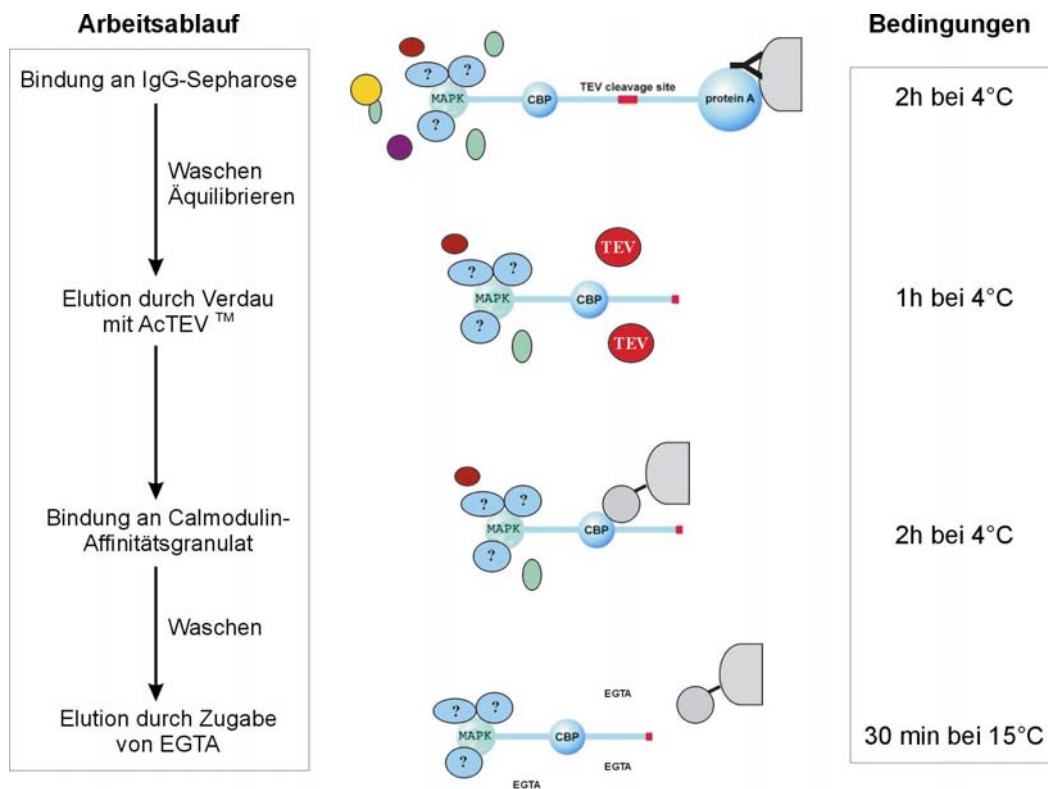


Abb. 3.17 Arbeitsablauf der Tandemaffinitätsreinigung und für die Aufreinigung von AtMPK3-TAP angewandte Bedingungen. Die Reinigung beginnt mit einer Affinitätschromatographie an einer IgG-Matrix gefolgt von der Abspaltung des gebundenen Proteins durch die TEV-Protease. Nach einem zweiten Affinitätsschritt an einer Calmodulin-haltigen Matrix werden gebundene Proteine durch Zugabe von EGTA eluiert. Die TAP-markierte MAPK und die putativen Interaktoren sind in hellblau dargestellt.

werden, dass die Protein A-Domäne der TAP-Markierung mit hoher Affinität vom F_c-Fragment fast aller für die Immunodetektion verwendeten Antikörpern gebunden wird. Beim Verdau mit der TEV-Protease wird die Protein A-Domäne jedoch abgeschnitten. Infolgedessen kann die vollständige AtMPK3-TAP mit Hilfe einer immunologischen Nachweismethode besser detektiert werden als die nach dem Verdau mit der TEV-Protease verbleibende modifizierte AtMPK3. Die Analyse der einzelnen Fraktionen der Aufreinigung mittels Immunodetektion führt deshalb wahrscheinlich zu einer Unterschätzung der eigentlichen Ausbeute. Auf Grund der sich extrem voneinander unterscheidenden Mengen an nachweisbarer modifizierter AtMPK3 vor und nach der Elution war aber davon auszugehen, dass es bei diesem Reinigungsschritt auch zu Verlusten kam. Zudem ging modifizierte AtMPK3 in den nachfolgenden Reinigungsschritten verloren, so dass im zweiten Eluat nur noch ein geringer Teil des Ausgangsmaterials vorhanden war (Abb. 3.18). Die Anreicherung von AtMPK3 mit Hilfe der TAP-Reinigung war demzufolge ineffizient.

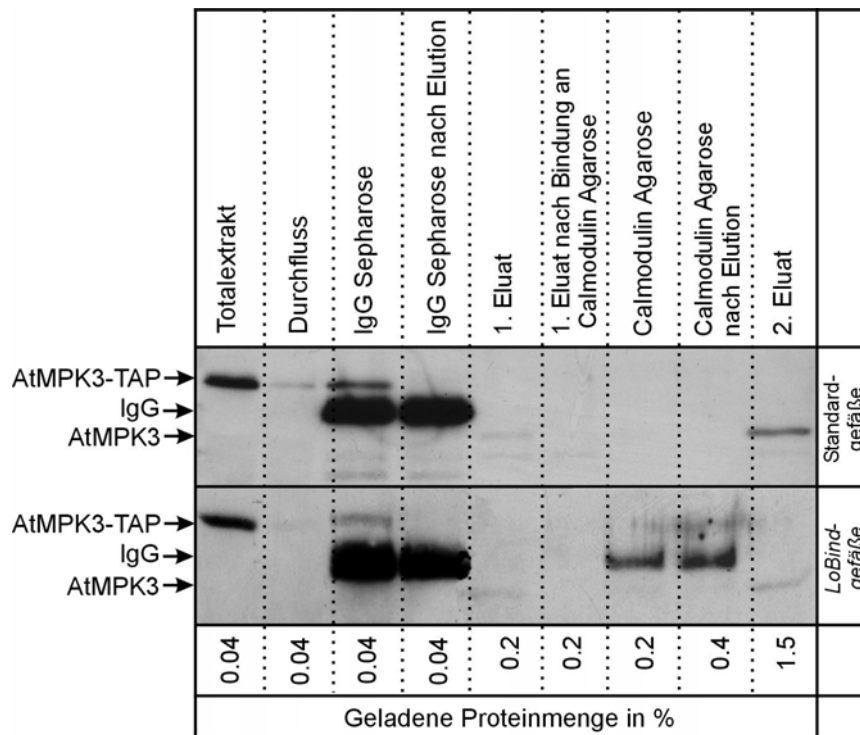


Abb. 3.18 Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3. Während der Aufreinigung wurden Aliquots von allen Reinigungsschritten genommen. Nach der Auftrennung der Proben in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel erfolgte die Analyse durch Immunodetektion mit Antikörpern gegen AtMPK3. Bei allen Aufreinigungen wurde zu Beginn 70 mg Gesamtprotein eingesetzt. Im oberen Teil der Abbildung ist die Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3-TAP #8 in Standardreaktionsgefäßen dargestellt. Im unteren Abschnitt ist die Aufreinigung von AtMPK3-TAP #8 in *Protein LoBind* Reaktionsgefäßen von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) gezeigt. Geladene Proteinmenge in % entspricht der jeweils von jedem Reinigungsschritt geladene Menge in %.

Eine genaue Quantifizierung von markierter AtMPK3 im Totalextrakt und im zweiten Eluat mit Hilfe von Immunodetektion würde die folgenden Arbeitsschritte erfordern. Zunächst müsste die in Totalextrakten vorhandene Ausgangsmenge von AtMPK3-TAP durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe von rekombinanter AtMPK3-TAP bestimmt werden. Nach dem gleichen Prinzip jedoch basierend auf einem Vergleich mit rekombinanter AtMPK3 könnte auch die im zweiten Eluat vorhandene Menge an aufgereinigter AtMPK3 bestimmt werden. Diese Verfahrensweise kam bereits bei der Auswertung der Ergebnisse für eine modifizierte Form der Tandemaffinitätsaufreinigung zum Einsatz (Burckstummer et al. 2006).

Als Ursachen für die geringe Elutionseffizienz nach dem Protease-Verdau kommen die folgenden Sachverhalte in Frage: (i) Die Elution durch die AcTEVTM-Protease war unvollständig. (ii) Eine Abspaltung der gebundenen AtMPK3-TAP durch die Protease hatte stattgefunden, aber das abgeschnittene Protein hat weiterhin unspezifisch an die IgG-Sepharose gebunden. (iii) AtMPK3-TAP adsorbierte an der Oberfläche der verwendeten Kunststoffmaterialien. (iv) Beim Waschen und Äquilibrieren der IgG-Sepharose gingen große Mengen an AtMPK3-TAP verloren. (v) AtMPK3 besitzt eine Schnittstelle für die AcTEVTM-Protease.

(vi) Es fand eine Co-Aufreinigung einer Protease aus *Arabidopsis thaliana* statt, wie sie bereits von Rohila et al. (2004) beobachtet wurde. (vii) Die partiell aufgereinigte AtMPK3-TAP war unter den gegebenen Bedingungen instabil.

Die ersten zwei Gründe für die geringe Effizienz der Elution mittels Protease-Verdau ließen sich bereits mit Blick auf die Abbildung 3.18. ausschließen. Es zeigte sich eindeutig, dass die Abspaltung der gebundenen AtMPK3-TAP von der IgG-Sepharose sehr effizient war (Vergleich 3. und 4. Bahn von links). Außerdem konnte nach der ersten Elution mit Hilfe der AcTEVTM-Protease keine unspezifische Bindung der abgespaltenen AtMPK3-TAP an die IgG-Sepharose nachgewiesen werden (4. Bahn von links). Inwieweit die anderen Gründe zu der ineffizienten Elution beigetragen haben könnten, wurde mit den in den folgenden Kapiteln dargestellten Experimenten analysiert.

3.4.2.2.1 Mögliche Bindung von TAP-markierter AtMPK3 an verwendete Kunststoff-Materialien

Proteine können über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Trägermaterial und Proteinmolekül an Plastikoberflächen binden. Die Fähigkeit der Proteine zur Adsorption wird zum Beispiel bei der Durchführung von ELISA-Tests zur Trennung von antikörpergebundenem und freiem Material genutzt. Bei der Aufreinigung und Lagerung von Proteinen sind Wechselwirkungen zwischen verwendeten Materialien und untersuchten Proteinen allerdings unerwünscht, da dadurch die Ausbeute deutlich reduziert werden kann.

Während des Verdauens mit der TEV-Protease wird AtMPK3-TAP von der gebundenen in die freie Form überführt und könnte somit an Plastikoberflächen adsorbieren. Im Vergleich zum Totalextrakt enthält das Eluat nach dem TEV-Verdau außerdem nur noch wenige Proteine und deshalb auch weniger Proteine, welche möglicher Weise mit den verwendeten Materialien Wechselwirkungen eingehen. Infolgedessen könnte es zu einer verstärkten unspezifischen Bindung von AtMPK3-Molekülen an Materialien kommen.

Unspezifische Bindungen von Proteinen an Trägermaterialien können durch Beschichtung der verwendeten Materialien mit Substanzen wie Dichlordimethylsilan verringert werden. Bei der Verwendung von derartig beschichteten Plastikmaterialien gelangen allerdings Bestandteile der Beschichtung in Lösung und verunreinigen die Probe. Diese Verunreinigungen können bei der weiteren Analyse mittels Massenspektrometrie störend wirken. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht versucht, die Elutionseffizienz der Aufreinigung von AtMPK3-TAP nach AcTEVTM-Verdau durch Beschichtung mit Dichlordimethylsilan zu verbessern.

Als Alternative zur Verwendung von beschichteten Plastik-Gefäßen sind spezielle *Protein LoBind Tubes* der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) erhältlich. In Testexperimenten

haftete den *LoBind Tubes* etwa zehnmal weniger BSA an als den Standardreaktionsgefäßen von Eppendorf. Abbildung 3.18 zeigt das Ergebnis einer Aufreinigung von AtMPK3-TAP unter Einsatz von *LoBind Tubes* aus einem Totalextrakt, welches 70 mg Gesamtprotein enthielt. Im Vergleich zu einer Aufreinigung von AtMPK3-TAP mit Standardreaktionsgefäßen, ausgehend von der gleichen Menge Gesamtprotein, wurde deutlich, dass sich die Elutionseffizienz nach dem TEV-Verdau durch Verwendung von *LoBind Tubes* nicht verbesserte.

Da für die Testaufreinigung in den *LoBind*-Reaktionsgefäßen keine Säulen eingesetzt wurden, kam es zu einer Verschleppung von IgG-Sephrose. Allerdings wurde die Verunreinigung mit IgG-Sephrose im Immunoblot nur in den Fraktionen detektiert, welche die Calmodulin-Agarose enthielten. Ursache hierfür ist das gute Resuspendieren der Calmodulin-haltigen Matrix vor Entnahme eines Aliquots für die Immunoblotanalyse.

3.4.2.2 Vergleich der Effizienzen der Tandemaffinitätsreinigungen von AtMPK3-TAP und AtTGA2-TAP

Außerdem galt es auszuschließen, dass die geringe Ausbeute an AtMPK3-TAP nach der Affinitätsreinigung auf ein allgemeines Problem bei der Durchführung der Reinigung zurückzuführen war. Deswegen wurde der TAP-markierte Transkriptionsfaktor TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* unter den gleichen Bedingungen aufgereinigt wie AtMPK3-TAP. Die Proteine AtTGA2 und AtMPK3 weisen keinerlei Ähnlichkeiten in der Sequenz auf. Somit konnten aus einer vergleichenden Aufreinigung von AtTGA2 und AtMPK3 Rückschlüsse über eventuelle experimentelle oder proteinspezifische Probleme gezogen werden.

Ausgangspunkt für die Affinitätsreinigung von AtTGA2-TAP bildeten wiederum 70 mg Protein aus einem Totalextrakt. Eine Quantifizierung der Bindung von AtTGA2 an die IgG-Sephrose war auf Grund der schlechten Qualität des gegen AtTGA2-gerichteten Antiserums nicht möglich. Im weiteren Verlauf der Aufreinigung gelang jedoch eine eindeutige Detektion von AtTGA2 (Abb. 3.19). Ähnlich wie bei der Aufreinigung von AtMPK3-TAP zeigten sich große Unterschiede in den durch Immunoblotanalyse detektierten Mengen von AtTGA2-TAP vor und nach Verdau mit der AcTEVTM-Protease. Ursachen hierfür sind einerseits die verstärkte Immunodetektion von TAP-markierten Proteinen in Vergleich zu unmarkierten Proteinen sowie andererseits eventuell auftretende Verluste des jeweils aufgereinigten Proteins. Während die modifizierte AtMPK3 in den nach dem TEV-Verdau folgenden Reinigungsschritten jedoch kaum noch detektierbar war, konnte die modifizierte Form von AtTGA2 hingegen stets eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem erfolgte die AtTGA2-

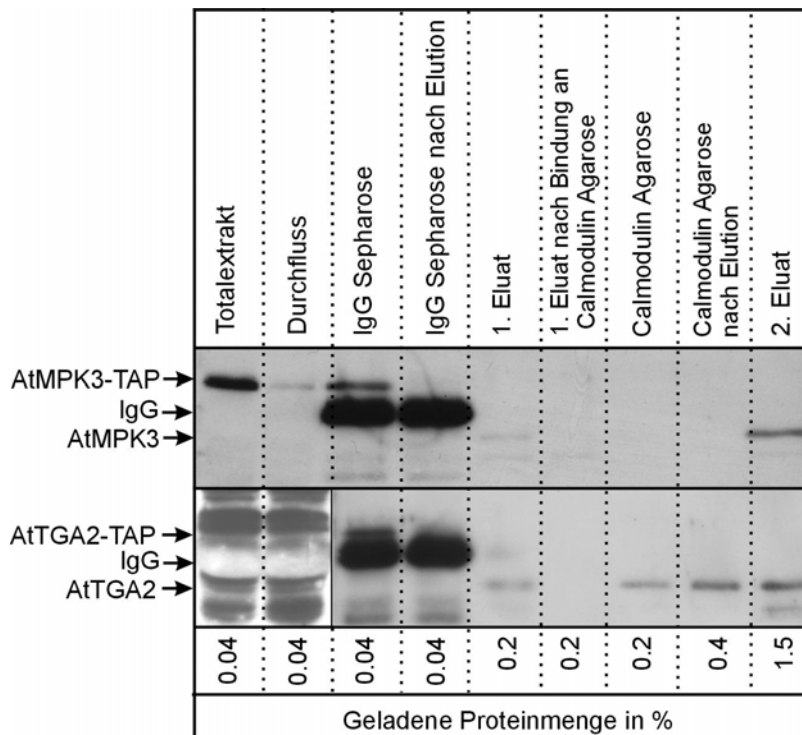


Abb. 3.19 Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3 und AtTGA2. Während der Aufreinigung wurden Aliquots von allen Reinigungsschritten genommen. Nach der Auftrennung der Proben in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel erfolgte die Analyse durch Immunodetektion mit Antikörpern gegen AtMPK3 bzw. AtTGA2. Bei allen Aufreinigungen wurde zu Beginn 70 mg Gesamtprotein eingesetzt. Im oberen Teil der Abbildung ist die Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3-TAP #8 in Standardreaktionsgefäßen dargestellt (entnommen aus Abbildung 3.18). Im unteren Abschnitt ist die Aufreinigung von AtTGA2-TAP gezeigt. Geladene Proteinmenge in % entspricht der jeweils von jedem Reinigungsschritt geladenen Menge in %.

Elution von der Calmodulin-Agarose mit geringer Effizienz, so dass nach einer Optimierung der TAP-Reinigung für AtTGA2-TAP mit einer deutlichen Steigerung der im letzten Eluat detektierbaren Menge an gereinigtem AtTGA2 zu rechnen wäre.

Die Ergebnisse der vergleichenden Tandemaffinitätsreinigung von AtTGA2 und AtMPK3 wiesen somit auf ein generelles Problem hin, welches im Zuge des Protease-Verdau die Effizienz der Reinigung herabsetzte. Während jedoch für AtMPK3 auch im weiteren Verlauf der Aufreinigung Verluste zu verzeichnen waren, konnte im Falle von AtTGA2 ein großer Teil des nach dem Protease-Verdau eluierten AtTGA2-Proteins weiter aufgereinigt werden.

3.4.2.2.3 Detaillierte Analyse der TAP-Reinigung von AtMPK3-TAP

Um auszuschließen, dass beim Waschen der IgG-Sepharose und bei der anschließenden Äquilibrierung mit TEV-Puffer große Mengen AtMPK3-TAP verloren gingen, wurden diese Fraktionen aufgefangen. Nach dem Aufkonzentrieren erfolgte die Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen. In einem SDS-Gel konnten die Proteine mit Hilfe von Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Ein weiteres SDS-Gel wurde mittels Immunoblot analysiert. Obwohl auf diese Weise jeweils 20% der gesamten Wasch- und Äquilibrierfraktionen untersucht

wurden, war es nicht möglich, in diesen Fraktionen die TAP-markierte AtMPK3 nachzuweisen (Abb. 3.20). Daher konnte ausgeschlossen werden, dass das Waschen und das Äquilbrieren der IgG-Sepharose nach Bindung des Totalextraktes den Grund für die geringe Effizienz des ersten Elutionsschrittes der AtMPK3-TAP-Reinigung darstellten.

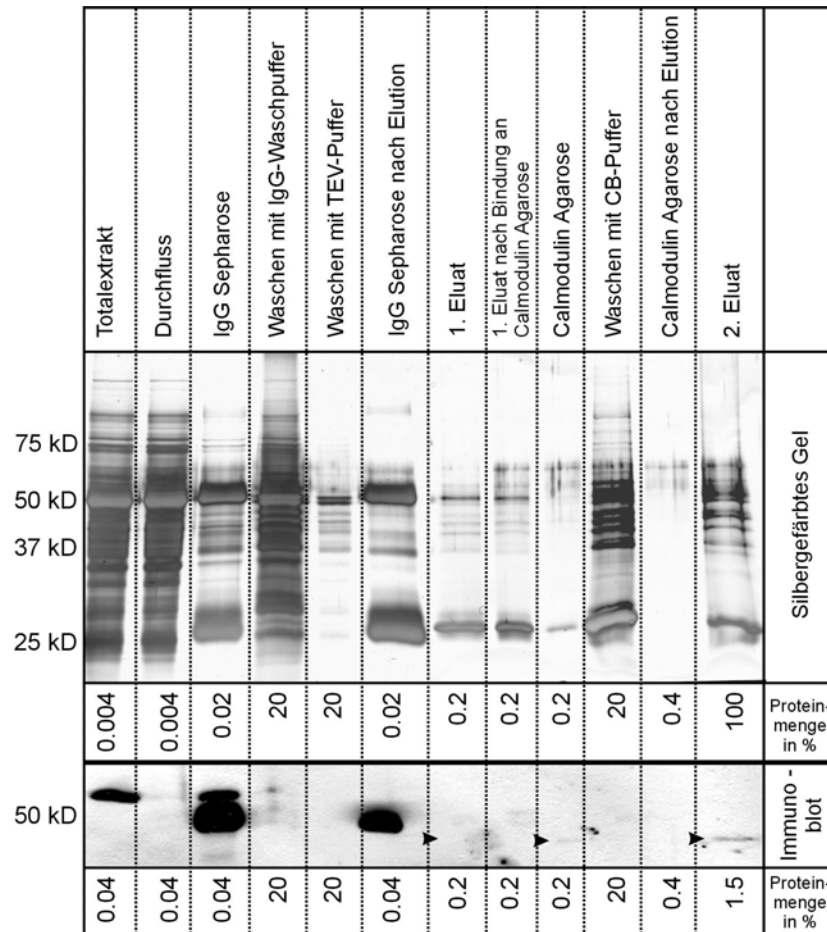


Abb.3.20 Detaillierte Analyse der Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3. Während der Aufreinigung wurden Aliquots von allen Reinigungsschritten inklusive Waschen und Äquilbrieren genommen und in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Silberfärbung bzw. Immunodetektion. Die Pfeilspitze kennzeichnet die markierte AtMPK3 nach der ersten Elution. Somit konnte gezeigt werden, dass durch das Waschen und Äquilbrieren der IgG-Sepharose die gebundene AtMPK3-TAP nicht abgelöst wurde. Geladene Proteinmenge in % entspricht der jeweils von jedem Reinigungsschritt geladenen Menge in %.

3.4.2.2.4 Mögliche Proteolyse der TAP-markierten AtMPK3

Mehrere der oben aufgeführten möglichen Ursachen für die ineffiziente Elution der AtMPK3-TAP nach dem Protease-Verdau lassen sich unter dem Begriff Proteolyse zusammenfassen. Zunächst galt es auszuschließen, dass die AtMPK3 eine Schnittstelle für die AcTEVTM-Protease besitzt. Als Erkennungsstelle für die AcTEVTM-Protease dient ein lineares Epitop mit der Sequenz E-X_{aa}-X_{aa}-Y-X_{aa}-Q↓(G/S), wobei der Pfeil die Schnittstelle markiert (Parks et al., 1994). In der Sequenz von AtMPK3 ist kein Abschnitt enthalten, welcher der verallgemei-

nernten Form der Erkennungsstelle der TEV-Protease entspricht (<http://msbi.ipb-halle.de/Metware/siteseeer/siteseeer.jsf>; 16.02.2007). Jedoch war es anhand des Sequenzvergleichs nicht möglich auszuschließen, dass eine sehr gut exponierte degenerierte Schnittstelle vorlag. Deshalb wurde rekombinant exprimiertes GST-Fusionsprotein von AtMPK3 mit einem 10fachen Überschuss an AcTEVTM-Protease bei Raumtemperatur verdaut und mittels SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung analysiert (Abb. 3.21 B). Nach einem Vergleich mit dem unbehandelten Fusionsprotein GST-AtMPK3 konnte ein Verdau der rekombinanten GST-AtMPK3 durch die AcTEVTM-Protease ausgeschlossen werden.

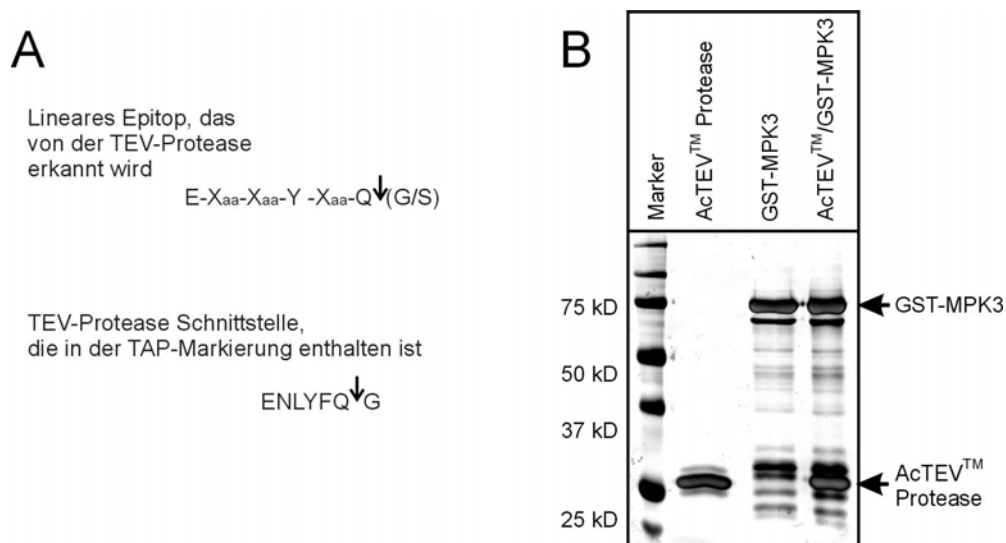


Abb.3.21 Untersuchung von AtMPK3 mit Blick auf eine mögliche Proteolyse durch die AcTEVTM-Protease. **(A)** Darstellung der verallgemeinerten Form der Erkennungsstelle der TEV-Protease sowie der im TAP-Tag enthaltenen Erkennungsstelle. Der Pfeil kennzeichnet dabei die Schnittstelle. **(B)** Ausschluss einer durch die TEV-Protease verursachten Proteolyse von AtMPK3. Nach der Inkubation von rekombinantem GST-AtMPK3-Protein mit einem zehnfachen Überschuss an Protease wurde das Proteingemische mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und silbergefärbt.

Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass bei der Inkubation des Totalextrakts mit der IgG-Sepharose eine Protease aus *Arabidopsis thaliana* gebunden wurde, welche während des Verdau mit AcTEVTM aktiv war. Eine derartige Co-Aufreinigung einer *Arabidopsis thaliana* Protease ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Rohila et al., 2004). In der Studie erfolgte die Hemmung der co-aufgereinigten Protease am effizientesten durch den E64 Cystein-Proteasehemmer. Bezugnehmend auf die Arbeit von Rohila et al. (2004) wurden hier die Elutionseffizienzen von an IgG-Sepharose gebundener AtMPK3-TAP nach TEV-Verdau unter Anwesenheit verschiedener TEV-Protease-kompatibler Proteaseinhibitoren verglichen. Bei dem im kleinen Maßstab durchgeführten Experiment konnte keine wesentliche Verbesserung der Elutionseffizienz durch Zugabe der Proteasehemmer erreicht werden (Abb. 3.22), obwohl auch in den Inhibitorgemischen von Roche und Sigma E64-Proteasehemmer enthalten war.

Demzufolge wurde während der Aufreinigung entweder keine Protease aus *Arabidopsis thaliana* angereichert oder die putativ angereicherte Protease konnte nicht durch die meisten gängigen Proteaseinhibitoren gehemmt werden. Trotzdem wurde bei allen weiteren Aufreinigungen von AtMPK3-TAP während des Verdauens mit der AcTEV™-Protease und während der Bindung an das Calmodulin-Affinitätsgranulat der Roche-Inhibitormix zugesetzt. Ob eine generelle Instabilität von gereinigtem AtMPK3-Fusionsprotein die Ursache für geringe Elutionseffizienz sein könnte, war aus verschiedenen Gründen zu bezweifeln. Einerseits kam im Rahmen dieser Arbeit bereits das rekombinant exprimierte Fusionsprotein GST-AtMPK3 zum Einsatz. In diesem Zusammenhang gab es keine Hinweise auf eine Instabilität von AtMPK3. Andererseits wurde rekombinant exprimiertes AtMPK3-Protein bereits im großen Maßstab in einer *in vitro* durchgeführten Hochdurchsatzanalyse zur Identifizierung von putativen Substraten von AtMPK3 eingesetzt (Feilner et al., 2005). Würde rekombinantes AtMPK3-Protein sehr leicht zerfallen, wäre die Durchführung des Protein-Microarrays wahrscheinlich nicht möglich gewesen.

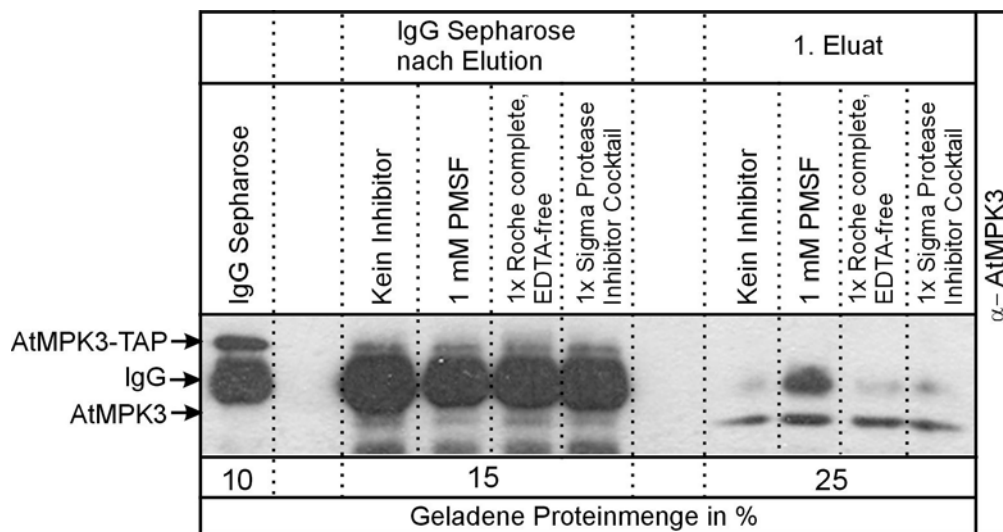


Abb. 3.22 Vergleich der Elutionseffizienz von an IgG-Sepharose gebundener AtMPK3-TAP nach TEV-Verdau unter Anwesenheit von verschiedenen TEV-Protease kompatiblen Proteaseinhibitoren. Nach Inkubation eines AtMPK3-TAP enthaltenden Totalextraktes mit IgG-Sepharose, dem Waschen und dem Protease-Verdau wurden die oben bezeichneten Proben elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und einer Immunodetektion unterzogen. Die Ausbeute an AtMPK3-Fusionsprotein konnte durch Zugabe von Proteaseinhibitoren nicht gesteigert werden. Geladene Proteinmenge in % entspricht der jeweils von jedem Reinigungsschritt geladenen Menge in %.

3.4.2.3 Tandemaffinitätsreinigung von TAP-markierter AtMPK3

Alle Versuche die Ursachen für die geringe Effizienz der Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3-TAP ausfindig zu machen, brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Daher erfolgte die Aufreinigung von TAP-markierter AtMPK3 aus dem Totalextrakt von 420 mg Protein nach den in Abbildung 3.17 dargestellten Bedingungen. Um Aussagen über die Spezifität der

AtMPK3-Aufreinigung treffen zu können, fand eine parallele Reinigung von Totalextrakten aus Pflanzenlinien statt, welche nur die TAP-Markierung enthielten (Vektorkontrolle). Nach der Auftrennung der jeweiligen Eluate in einem denaturierenden Gradientengel wurden die Proteine mit Silber angefärbt (Abb. 3.23). Trotz zweistufiger Affinitätschromatographie erwiesen sich die am Ende erhaltenen Eluate als Proteinmischungen von komplexer Zusammensetzung. Somit wurde das Ziel, den Reinigungsgrad von AtMPK3 und mit ihr assoziierter Proteine durch Tandemaffinitätsreinigung zu erhöhen, nicht erreicht. Probleme mit einer komplexen Zusammensetzung von Proteinmischungen nach der Tandemaffinitätsreinigung wurden bereits beschrieben (Benzinger et al., 2005).

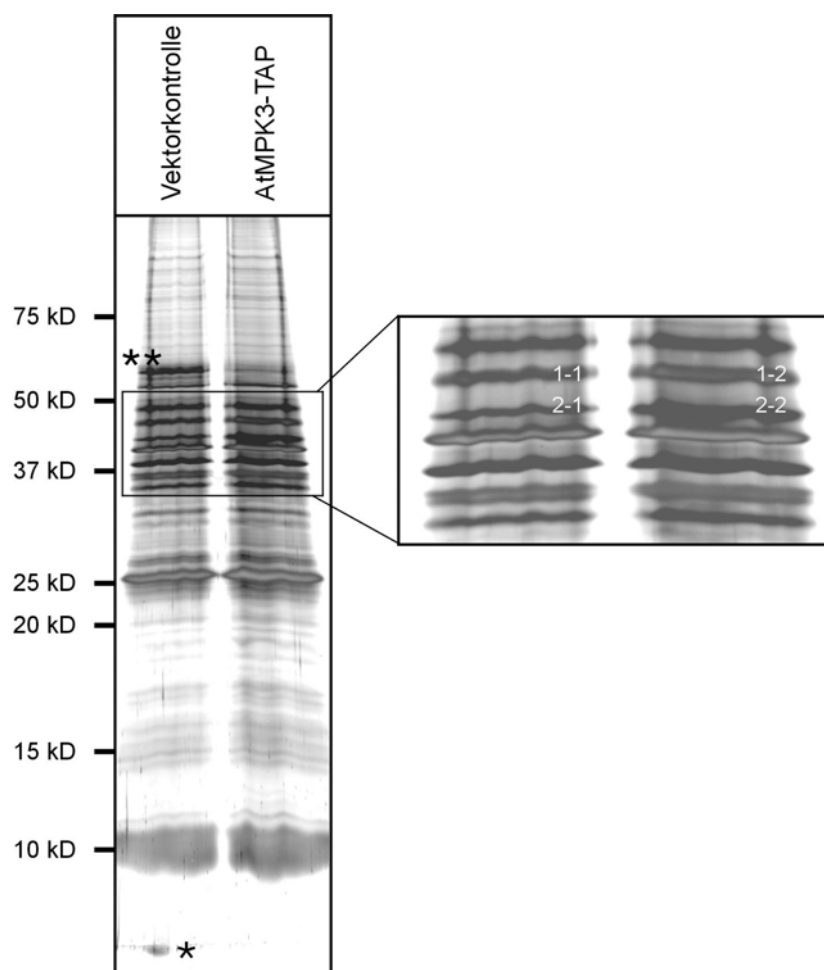


Abb. 3.23 Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3-TAP ausgehend von 420 mg Gesamtprotein. Nach der Aufkonzentrierung der Eluate erfolgte die Auftrennung in einem denaturierenden Gradientengel (5 bis 12,5%). Durch die Silberfärbung wurde deutlich, dass es sich bei den Eluaten aus der Aufreinigung von AtMPK3-TAP um komplex zusammengesetzte Proteinmischungen handelte. Bei dem mit einem * gekennzeichneten Protein handelt es sich wahrscheinlich um die nach der vollständigen Reinigung in der Vektorkontrolle verbleibenden Reste der TAP-Markierung. Im Bereich um 45 kD kamen zwei Unterschiede im Proteinmuster zwischen Kontrolle und AtMPK3 zum Vorschein (siehe Ausschnittsvergrößerung), welche massenspektrometrisch analysiert wurden. Die Ergebnisse der MS-Analyse sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Außerdem zeigte sich in der Vektorkontrolle eine ungeklärte Abweichung im Proteinmuster mit einem Molekulargewicht von circa 60 kD (**).

Durch den optischen Vergleich der Bandenmuster von Vektorkontrolle und AtMPK3-TAP konnten im Bereich unter 10 kD, zwischen 45 und 50 kD sowie bei circa 60 kD Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteinproben ermittelt werden. Bei dem in der Vektorkontrolle detektierbaren etwa 5 kD großen Protein handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um den am Ende der Aufreinigung am Zielprotein verbleibenden Rest der TAP-Markierung, der sich aus Calmodulin-Bindedomäne und Teilen der Schnittstelle der TEV-Protease zusammensetzt. Eine Peptidmassen-Fingerprint-Analyse eines artifiziellen Proteins von so geringer Größe war allerdings nicht möglich. Die Gründe für eine Anreicherung eines oder mehrerer etwa 60 kD großer Proteine in der Vektorkontrolle konnten nicht geklärt werden.

Die Differenzen in der Zusammensetzung der Proteinmischungen im Bereich zwischen 45 und 50 kD spiegelten möglicher Weise die Anwesenheit der aufgereinigten AtMPK3 wider. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Banden sowie die dazugehörigen Banden in der Kontrollaufreinigung ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Mittels MALDI-TOF MS kann das Verhältnis von monoisotopischer Masse m zur Ladung z von Peptiden, die nach proteolytischem Verdau entstanden sind, mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ Dalton ermittelt werden. Die Bestimmung der Peptidmassen resultiert in sogenannten Peptidmassen-Fingerprints (PMFs), die ein von der Proteinsequenz abhängiges Muster aufweisen. Die Sequenzierung des Genoms von Modellsystemen wie *Arabidopsis thaliana* macht einen *in silico* Protease-Verdau der abgeleiteten Proteinsequenzen möglich. Mit Hilfe von Datenbanken können die *in silico* Verdau mit den gemessenen PMFs verglichen und Proteine identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu enthalten Daten aus LC-MS/MS-Messungen neben den Peptidmassen auch Sequenzinformationen, wodurch die Datenbanksuche wesentlich spezifischer wird. Daher ist bei der Untersuchung von Gemischen aus verschiedenen Proteinen eine Analyse der Proben mittels LC-MS/MS einer Analyse der Proben mittels MALDI-TOF MS vorzuziehen. Aus Zeitgründen ist ein derartige Untersuchung der Proben, die aus dem in Abbildung 3.23 dargestellten Proteingel erhalten wurden, nicht mehr möglich gewesen.

Der PMF von AtMPK3, die über das TAP-Verfahren angereichert wurde, ist nicht mit dem PMF von Wildtyp-AtMPK3 identisch, weil sich immer noch Reste der TAP-Markierung am Protein befinden. Außerdem handelt es sich bei der TAP-Markierung um eine artifizielle Sequenz, welche so nicht in der *Arabidopsis thaliana*-Datenbank erfasst ist. Daher würde die Gleichsetzung des PMFs der modifizierten AtMPK3 mit dem PMF der Wildtyp-AtMPK3 das Ergebnis der Datenbanksuche und die maximal erreichbare Sequenzabdeckung negativ beeinflussen. Infolgedessen wurde die Auswertung der MALDI-TOF MS-Daten nach den im folgenden erläuterten Parametern optimiert (Abb. 3.24 A). Zunächst wurden die PMFs der

Vektorkontrolle von den entsprechenden PMFs der Tandemaffinitätsaufreinigung von AtMPK3-TAP mit Hilfe des Programms mMass (<http://mmass.biographics.cz>; 15.02.2007) subtrahiert. Außerdem wurde die TAP-markierte AtMPK3 mit mMass einem theoretischen Trypsin-Verdau unterzogen. Dadurch konnten Peptide, welche auf die Reste des TAP-Tags zurückzuführen waren, ermittelt werden. Da diese auf einer artifiziellen Proteinmarkierung beruhenden Peptidsequenzen nicht Bestandteil von Sequenzdatenbanken wie MASCOT (Matrix Science) sind, wurden die entsprechenden Peptide aus den Peptidlisten gestrichen. Die korrigierten PMFs wurden anschließend mit MASCOT untersucht.

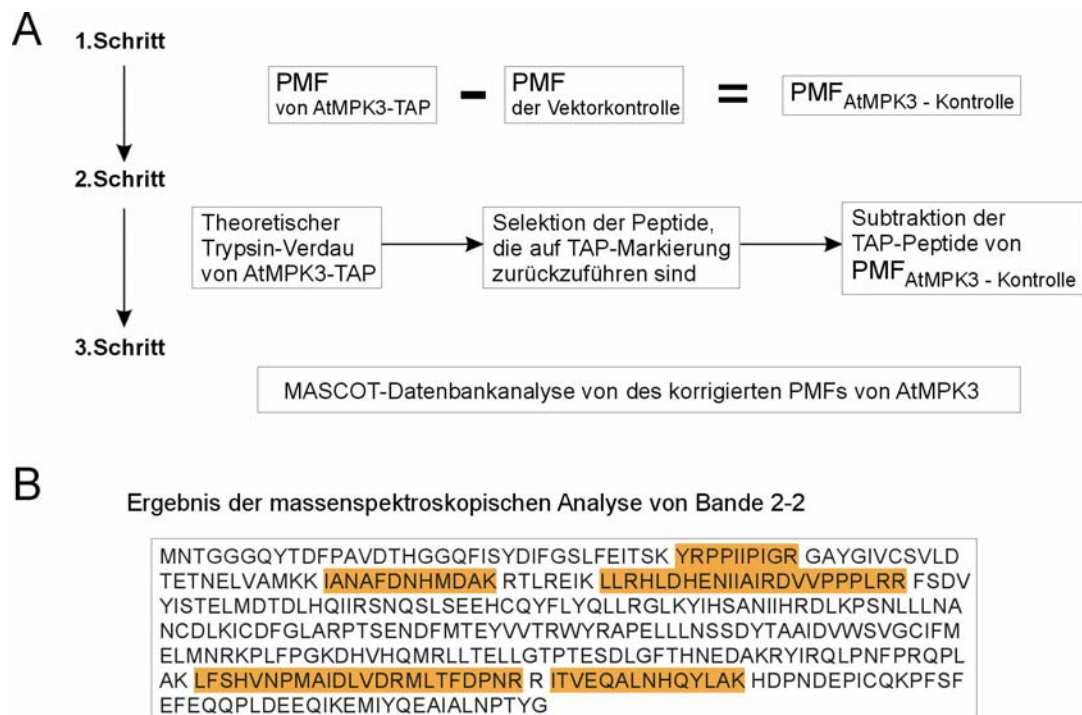


Abb. 3.24 Ergebnis der MALDI-TOF MS-Analyse von Bande 2-2, die aus dem in Abbildung 3.23. dargestellten Proteingel isoliert wurde. **(A)** Arbeitsverlauf bei der Auswertung der MS-Analyse. Da es sich bei der TAP-Markierung um ein artifizielles Protein handelt, welches nicht in dieser Form in den Sequenzdatenbanken erfasst ist, mussten die Daten vor der Auswertung mit MASCOT auf die oben aufgeführte Art und Weise korrigiert werden. **(B)** Proteinsequenz von AtMPK3. Bereiche, die in der MS-Analyse als Peptide von AtMPK3 identifiziert wurden, sind mit orange markiert. Insgesamt wurde eine Sequenzabdeckung von 20 % erreicht.

Mehrere Peptide aus dem PMF, der aus der Messung einer Probe von Bande 2-2 (Abb. 3.23) erhalten wurde, konnten nach der Datenbanksuche mit MASCOT der Sequenz von AtMPK3 zugeordnet werden (Abb. 3.24 B). Insgesamt entsprach dies einer Sequenzabdeckung von 20 %. Im Vergleich dazu kann für AtMPK3 nach einem Trypsin-Verdau und der Messung des PMFs in einem Fenster von 800 bis 3300 m/z theoretisch eine maximale Sequenzabdeckung von 73 % erreicht werden. Durch eine Optimierung der Probenvorbereitung wäre es wahrscheinlich möglich die gemessene Sequenzabdeckung der theoretisch messbaren

Sequenzabdeckung noch weiter anzunähern. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Bande 2-2 unter anderem AtMPK3 enthält. Im Gegensatz dazu konnten aus der Probe von Bande 1-2 weder AtMPK3 noch andere, als putative Interaktionspartner in Frage kommende Proteine identifiziert werden. Die Peptide aus dem PMF ließen sich lediglich Proteinen wie beispielsweise Rubisco zuordnen, die in der Zelle relativ abundant vorliegen. Diese verbreitet vorkommenden Zellproteine wurden auch schon in einer Studie zu Protein-Protein-Interaktionen von Proteinkinasen in *Oryza sativa* von der Liste putativer Interaktoren gestrichen (Rohila et al., 2006).

Da die Zielsetzung einer Anreicherung von AtMPK3 mit hohem Reinigungsgrad aus Totalextrakten von *Arabidopsis thaliana* nicht vollständig realisiert wurde, stellte sich die Frage nach Möglichkeiten für die Analyse von komplexen Proteingemischen. Wie bereits unter Kapitel 3.3 beschrieben, können diese Untersuchungen mittels mehrdimensionaler Chromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (z.B. Mudpit-Verfahren nach Graumann et al., 2004) bzw. mittels 2D-Gelelektrophorese mit anschließender massenspektrometrischer Analyse erfolgen. Mit Hilfe von MudPit konnten zum Beispiel 117 putative Liganden des 14-3-3 σ -Proteins identifiziert werden (Benzinger et al., 2005). Für eine MudPit-Analyse oder ähnliche Analyseverfahren bedarf es neben den technischen Voraussetzungen auch der nötigen Erfahrung in der Durchführung derartiger Experimente. Daher wurde zunächst entschieden, die Komplexität der TAP-Eluate über 2D-Gelelektrophorese zu reduzieren und nach signifikanten Unterschieden im Proteinmuster zu suchen.

Während der 2D-SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine eines Extraktes in einem ersten Arbeitsschritt nach ihren pI-Werten aufgetrennt. In Vorbereitung auf die isoelektrische Fokussierung (IEF) sollten daher störende Substanzen wie Salze und ionische Detergenzien aus der Probe entfernt werden. Dazu ist es üblich die Proteine zu fällen, das Pellet zu waschen und in einem für die IEF geeigneten Puffer wieder aufzunehmen.

Im vorliegenden Fall war davon auszugehen, dass es sich beim zweiten Eluat der Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3-TAP um eine stark verdünnte Proteinlösung handelt. Für die Fällung von stark verdünnte Proteinlösungen wird häufig eine Methode basierend auf einer TCA/Aceton-Fällung empfohlen wird. Hier war es allerdings nicht möglich die Proteine in den Eluaten mit dieser Methode zu fällen. Es musste daher davon ausgegangen werden, dass die Proteinkonzentration in den Eluaten für eine effiziente Fällung zu niedrig war. Als Alternative dazu wurden die Eluate mit Hilfe von Ultrafiltration über Centricons® (Millipore) aufkonzentriert. Da trotzdem offenbar zu viele störende Substanzen in den Proben zurückblieben, gelang es nicht, die auf diese Weise aufkonzentrierten Eluate einer IEF zu unterziehen.

Es wäre denkbar, die Komplexität der Eluate, wie in Abbildung 3.23 dargestellt, durch Auftrennung in einem eindimensionalen Proteingel zu reduzieren. Nach dem Anfärben der Proteine und der Unterteilung der Gelbahn in verschiedene Abschnitte könnten die einzelnen Teilstücke anschließend getrennt voneinander mit LC-MS/MS oder ähnlichen Verfahren untersucht werden. Diese Verfahrensweise wurde bereits bei der Identifizierung von 1543 Proteinen aus dem Proteom des menschlichen Urins erfolgreich angewandt (Adachi et al., 2006).

3.4.2.4 Aufreinigung von AtMPK3 basierend auf einer einstufigen Affinitätschromatographie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Tandemaffinitätsreinigung und den für die Analyse der Eluate zur Verfügung stehenden Mitteln zwar die aufgereinigte AtMPK3, aber keine putativ assoziierten Proteine identifiziert werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass keine Proteine mit der AtMPK3 assoziiert waren bzw. dass diese durch die Aufreinigung verloren gingen. Andererseits betrug das Verhältnis zwischen AtMPK3 und ihren Interaktoren eventuell nicht 1:1, sondern es lag bezüglich der Interaktoren ein ungünstigeres Verhältnis vor. Dadurch konnten AtMPK3 interagierende Proteine möglicherweise durch die hier eingesetzten MS-basierten Analysemethoden nicht nachgewiesen werden. Wenn letzteres der Fall wäre, sollte sich das Problem beheben lassen, indem für die TAP-Technologie eine größere Menge an Pflanzenmaterial eingesetzt wird oder ein Weg gefunden wird, AtMPK3 effizienter aufzureinigen. Der Einsatz von mehr Pflanzenmaterial für die TAP-Verfahren wurde hier nicht in Betracht gezogen, da auf diese Weise der Reinigungsgrad der AtMPK3 nicht verbessert worden wäre und die Möglichkeiten für eine Analyse der komplex zusammengesetzten TAP-Eluate begrenzt waren.

Die zweistufige TAP-Methode führt sowohl in klassischer als auch in abgewandelter Form zu einem höheren Reinheitsgrad der Zielproteine (Rigaut et al., 1999; Kaneko et al., 2004). Jede bisher für die Aufreinigung von Proteinen verwendete Markierung hat jedoch verschiedene Vor- und Nachteile bezüglich der Effizienz, des untersuchten Organismus und der Kosten (Chang, 2006). Deshalb wurde nach Alternativen zur Tandemaffinitätsreinigung im klassischen Sinne gesucht. Wie generell bei Proteinreinigungen geht bei jedem TAP-Aufreinigungsschritt auch ein Teil des Zielproteins verloren. Die alternative Methode sollte deshalb weniger Arbeitsschritte umfassen als die TAP-Methode und somit eine Reduktion der Verluste an AtMPK3-TAP ermöglichen.

Im Zuge der auf MS-basierenden Proteomanalyse konnten bereits in verschiedenen eukaryotischen Systemen mittels einstufiger Affinitätsreinigung Proteinkomplexe isoliert und

identifiziert werden. In einer großangelegten Studie mit dem Ziel der Generierung von Protein-Protein-Interaktionskarten von *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein auf der FLAG-Markierung beruhender Ansatz zur Affinitätsreinigung eingesetzt (Ho et al., 2002). In Pflanzen kam eine vergleichende Analyse von drei verschiedenen Aufreinigungsstrategien zu dem Ergebnis, dass die Verwendung der StrepII-Markierung ähnliche Ergebnisse liefert wie die TAP-Aufreinigung (Witte et al., 2004). Für diese Arbeit befanden sich AtMPK3-StrepII exprimierende Pflanzen in Vorbereitung, welche allerdings nicht mehr untersucht werden konnten. Um dennoch eine Affinitätsreinigung von AtMPK3 in Form eines einstufigen Verfahrens testen zu können, wurde die Reinigung nach der Bindung von AtMPK3-TAP an die IgG-Sepharose unterbrochen und die gebundenen Proteine durch Zugabe von 100 mM Glycin pH 3,0 eluiert.

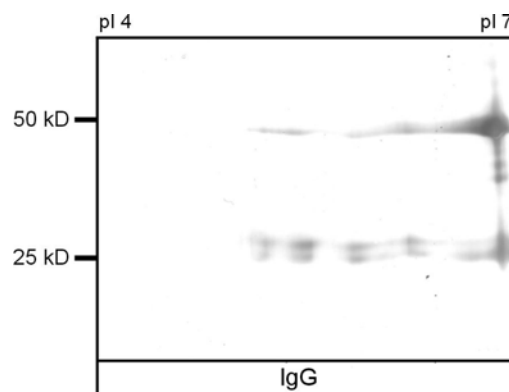


Abb. 3.25 2D-Gelelektrophorese der IgG-Untereinheiten, welche durch Veränderung des pH-Wertes von der IgG-Sepharose gelöst werden. Bei einem Fokus der ersten Dimension auf pI 4 bis 7 konzentrierte sich der größte Anteil der gelösten IgG-Untereinheiten in einem Bereich zwischen pI 6 und pI 7 sowie bei einem Molekulargewicht von 25 und 50 kD.

Als Analyseverfahren für die einstufige Reinigung von AtMPK3-TAP sollte die 2D-Gelelektrophorese gefolgt von der Massenspektrometrie eingesetzt werden. Gleichzeitig stellte sich die Frage, inwieweit die verschiedenen Untereinheiten des IgG-Proteinkomplexes trotz ihrer kovalenten Kopplung an die Sepharose durch die Veränderung des pHs gelöst werden und mit den gebundenen Proteinen koeluieren. Aus diesem Grund wurde ein Eluat eines nicht mit Totalextrakt behandelten Aliquots IgG-Sepharose mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine anschließend visualisiert (Abb. 3.25). Dadurch konnte das Ausmaß der Kontamination der Eluate mit IgG deutlich gemacht werden. Im 2D-Gel mit der ersten Dimension von pI 4 bis 7 konzentrierte sich der größte Anteil der abgelösten IgG-Untereinheiten in einem begrenzten Bereich zwischen pI 6 und pI 7 sowie bei einem Molekulargewicht von 25 und 50 kD. Zweidimensionale Gelelektrophorese gefolgt von massenspektrometrischer Analyse sollte sich demzufolge für eine Untersuchung von AtMPK3 durch einstufige Tandemaffinitätsreinigung eignen.

Die einstufige auf der TAP-Markierung basierende Reinigung bestand aus drei Schritten: (i) Bindung der AtMPK3-TAP and die IgG-Sepharose, (ii) Waschen der IgG-Sepharose sowie (iii) Elution der gebundenen Proteine mit viermal einem Bettvolumen Elutionspuffer. Die einzelnen Schritte wurden wiederum mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunodetektion kontrolliert (Abb. 3.26 B und C).

Da die TAP-Markierung bei der einstufigen Reinigung vollständig erhalten blieb, konnte das Bindungs- und Elutionsverhalten des TAP-Proteins (Vektorkontrolle) analog zu AtMPK3-TAP untersucht werden. Sowohl für die Kontrolle als auch für AtMPK3-TAP zeigte sich, dass

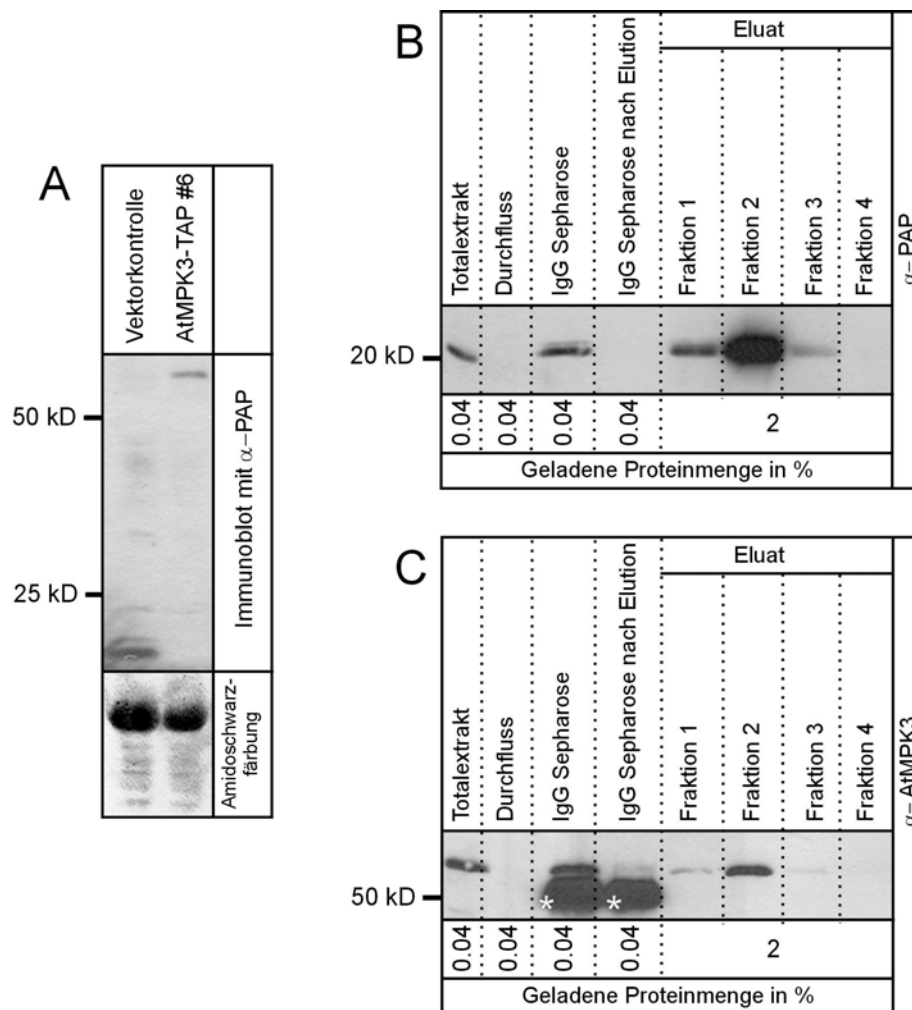


Abb. 3.26 Vergleich der Expressionsniveaus und der Effizienz der Aufreinigung von TAP-Protein und AtMPK3-TAP. **(A)** Mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse von je 20 μ g Totalproteinextrakt konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsniveaus von TAP-Protein und AtMPK3-TAP nur geringfügig voneinander unterscheiden. **(B)** und **(C)** Während der einstufigen Reinigung wurden Aliquots von allen Reinigungsschritten genommen und anschließend in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach erfolgte die Analyse mittels Immunodetektion mit einem gegen die Protein A-Bindedomäne (α -PAP) bzw. gegen AtMPK3-gerichteten Antikörper. Sowohl für das TAP-Protein (Vektorkontrolle; B) als auch für AtMPK3-TAP (C) war die Bindung und Elution sehr effizient. Außerdem eluierte der größte Anteil des jeweiligen Proteins in der zweiten Fraktion. Im Vergleich wird allerdings deutlich, dass das TAP-Protein stärker angereichert werden konnte als AtMPK3-TAP. Die mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Banden entsprechen der schweren Kette des IgG. Geladene Proteinmenge in % entspricht der jeweils von jedem Reinigungsschritt geladenen Menge in %.

Bindung und Elution sehr effizient erfolgten sowie der größte Anteil des Proteins in der zweiten Fraktion eluierte. Daher wurde zur weiteren Analyse der einstufigen TAP-Methode durch 2D-Gelelektrophorese gefolgt von Silberfärbung bzw. Immunoblot stets die zweite Fraktion eingesetzt. Bei genauer Betrachtung war allerdings auffällig, dass das TAP-Protein offenbar stärker angereichert werden konnte als AtMPK3-TAP (Abb. 3.26 B und C). Eine Immunoblotanalyse mit einem gegen den TAP-Tag gerichteten Antikörper zeigte eindeutig, dass sich die Expressionsniveaus vom TAP-Protein und von AtMPK3-TAP nur geringfügig unterschieden (Abb. 3.26 A). Daher lässt sich ein Unterschied in der Anreicherung nicht mit unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial begründen.

In Vorbereitung der 2D-Gelelektrophorese wurden die pI-Werte und das Molekulargewicht (MG) vom TAP-Tag und der AtMPK3-TAP mit Hilfe eines Programms vom *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html; 26.01.2007) ermittelt. Aus diesen Berechnungen ergaben sich die folgenden Werte: pI bzw. MG des TAP-Protein 6,32 bzw. 20,5 kD sowie pI bzw. MG von AtMPK3-TAP 5,76 bzw. 63,2 kD. Damit konnte der Bereich, in dem die Proteine erwartet wurden, eingegrenzt werden.

Eine Überlagerung der 2D-Gele von Vektorkontrolle und AtMPK3-TAP zeigte zwei deutliche Unterschiede im Proteinmuster (Abb. 3.27). Da pI-Wert und Molekulargewicht des besonders dominanten Spots in etwa den vorher berechneten Werten für das TAP-Protein entsprechen, sollte es sich in diesem Fall um das TAP-Protein handeln. Bei dem zweiten nachgewiesenen deutlichen Unterschied im Proteinmuster könnte eine modifizierte Form des TAP-Protein vorliegen. Eine Immunoblotanalyse der 2D-Gele bestätigte diese Annahmen (Abb. 3.27). Es folgte eine massenspektrometrische Untersuchung der beiden in der Vektorkontrolle angereicherten Proteine. Im Anschluß an die MALDI-TOF MS-Messungen wurden die erhaltenen Peptidlisten mit dem Programm mMass ausgewertet (Abb. 3.28). Dadurch konnten Peptidmassen aus dem theoretischen Trypsin-Verdau der TAP-Markierung den gemessenen Peptid-Peaks zugeordnet werden. Für Spot 1 ergab sich auf diese Weise eine Sequenzabdeckung von 59 % und für Spot 2 eine Sequenzabdeckung von 13 % (Abb. 3.28). Demzufolge liegen eindeutige Hinweise vor, dass es sich bei dem Protein aus Spot 1 um die in der Vektorkontrolle exprimierte TAP-Markierung handelt. Die Identität der Proteine aus Spot 2 konnte mittels MALDI-TOF MS gefolgt von einer Auswertung mit mMass nicht hinreichend geklärt werden. Eine Auswertung mit Hilfe von Datenbanken wie MASCOT ermöglicht keine Identifizierung von artifiziellen Proteinen wie der TAP-Markierung, da derartige Proteine in diesen Datenbanken nicht erfasst sind.

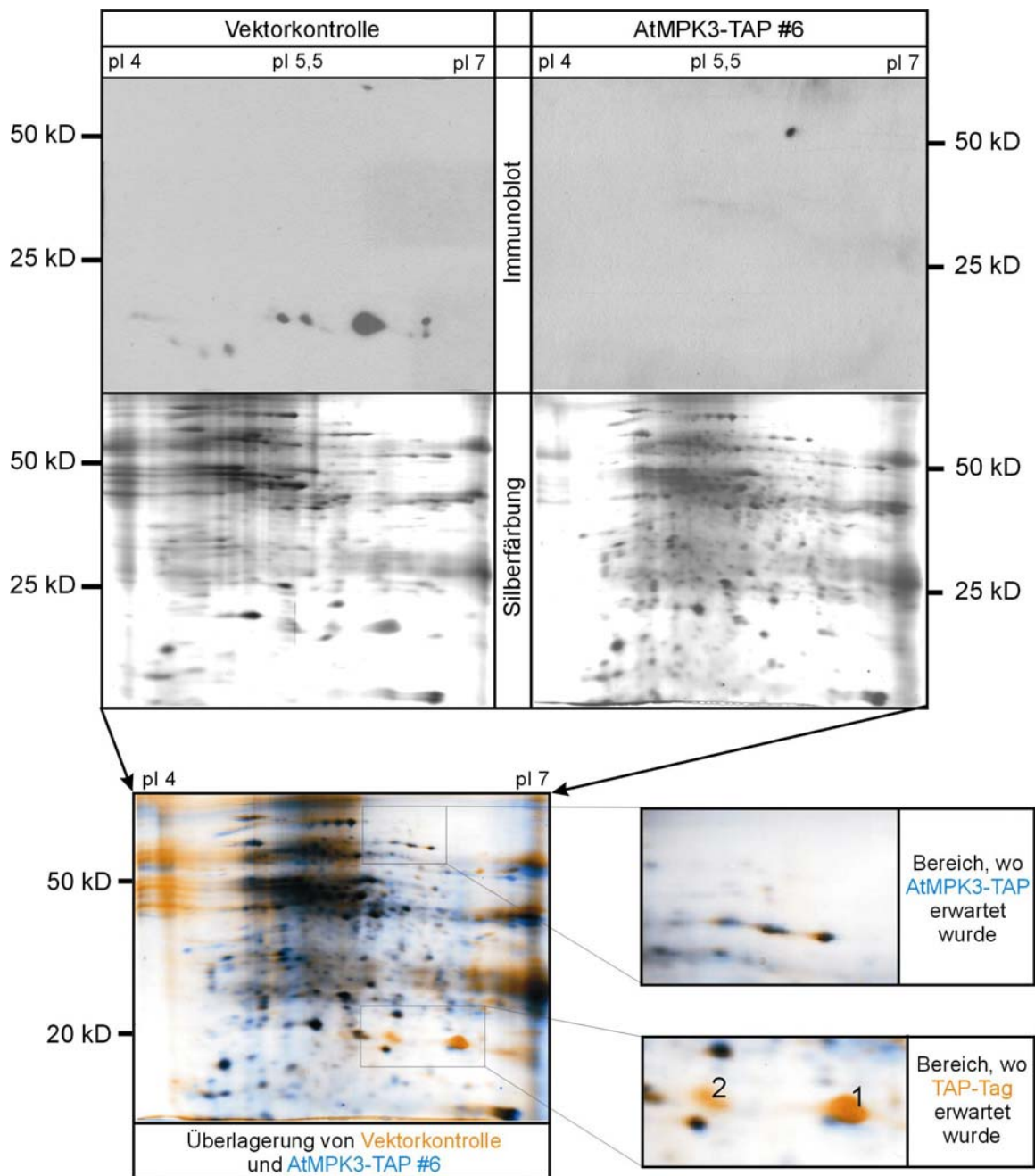


Abb.3.27 Analyse der einstufigen Aufreinigung durch 2D-Gelelektrophorese gefolgt von Immunoblotanalyse und Silberfärbung. Die vergleichende Immunoblotanalyse der Eluate der einstufigen Affinitätsreinigung erfolgte mit einem gegen die TAP-Markierung gerichteten Antikörper. Es kam zu einer deutlichen Anreicherung des TAP-Proteins. Die Anreicherung von AtMPK3-TAP schlug fehl. Es gilt zu beachten, dass auf Grund der sich sehr stark voneinander unterscheidenden Anreicherungen von TAP-Protein und AtMPK3-TAP den dargestellten Immunoblots unterschiedliche Entwicklungszeiten zugrunde liegen (TAP-Protein 1 min ; AtMPK3-TAP 15 min).

In den 2D-Gelen für die Silberfärbung wurden jeweils 10 µg Protein des jeweiligen Eluats aufgetrennt. Durch die Überlagerung der silbergefärbten 2D-Gele der Vektorkontrolle (TAP-Tag) und von AtMPK3-TAP wurden zwei starke Unterschiede im Proteinmuster deutlich, bei denen es sich um Isoformen des TAP-Proteins handeln könnte. Es konnte jedoch keine Anreicherung von TAP-markiertem AtMPK3-Protein sichtbar gemacht werden. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Immunodetektion von TAP-Protein und AtMPK3-TAP.

Im Gegensatz dazu war in dem Gebiet, wo auf Grund der Berechnungen AtMPK3-TAP erwartet wurde, kein angereichertes Protein nachweisbar. Wurde nur das Molekulargewicht von 63,2 kD berücksichtigt und deshalb der gesamte Bereich um 60 kD nach AtMPK3-TAP abgesucht, konnte auch kein angereichertes Protein identifiziert werden (Abb. 3.27). Durch Immunoblotanalysen konnten immerhin Spuren von modifizierter AtMPK3 im vorhergesagten Bereich nachgewiesen werden (Abb. 3.27). Somit konnte durch eine einstufige Reinigung zwar das TAP-Protein, jedoch nicht die AtMPK3-TAP angereichert werden. Wie im Falle der zweistufigen Tandemaffinitätsreinigung kommt es während der Aufarbeitung des AtMPK3-TAP-Materials zu enormen Verlusten modifizierter AtMPK3, deren Ursachen nicht geklärt werden konnten.

Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse von Spot Nr.1

```
MEKRRWKK NFI AVSAANR FKKISSSGALDYDIPTTASENLYFQGELK TAAL AQHDEAVDNK
FNKEQQNAFY EILHLPNLN EEQR NAFIQLSKDDPSQSANLLAEAK KLND AQAPKVDNKFNK
EQQNAFY EILHLPNLN EEQR NAFIQLSKDDPSQSANLLAEAK KLNG AQAPKVDANSAGKST
```

Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse von Spot Nr.2

```
MEKRRWKK NFI AVSAANR FKKISSSGALDYDIPTTASENLYFQGELK TAAL AQHDEAVDNK
FNKEQQNAFY EILHLPNLN EEQR NAFIQLSKDDPSQSANLLAEAK KLND AQAPKVDNKFNK
EQQNAFY EILHLPNLN EEQR NAFIQLSKDDPSQSANLLAEAK KLNG AQAPKVDANSAGKST
```

Abb. 3.28 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der beiden in der Vektorkontrolle angereicherten Proteine. Im Anschluss an die MALDI-TOF MS-Messungen wurden die erhaltenen Peptidlisten mit dem Programm mMass ausgewertet. In der Proteinsequenz des TAP-Proteins sind die durch MS-Analyse identifizierten Peptide orange markiert. Dadurch ergab sich für Spot 1 eine Sequenzabdeckung von 59 % und für Spot 2 eine Sequenzabdeckung von 13 %. Demzufolge handelt es sich bei dem Protein aus Spot 1 um die in der Vektorkontrolle exprimierte TAP-Markierung. In der Probe aus Spot 2 konnten hingegen nur Spuren des TAP-Tags nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 MAPK-vermittelte Signalgebung als Summe dynamischer Prozesse

Die Fähigkeit, extra- und intrazelluläre Signale wahrzunehmen und zu verarbeiten, ist für das Überleben aller Organismen essentiell. Dabei werden die vielfältigen Stimuli auf verschiedenen Wegen in das Signalnetzwerk der Organismen integriert und bewirken eine Vielzahl von Reaktionen. Die Basis für die Funktionalität des Signalnetzwerkes bilden sehr unterschiedlich gestaltete dynamische Prozesse. Auf zellulärer Ebene kommt es zum dynamischen Zusammenspiel zwischen verschiedenen Signalereignissen und Signalwegen. Dahingegen äußert sich Dynamik auf der molekularen Ebene der Signalnetzwerke in der ständig wechselnden räumlichen und zeitlichen Verteilung der einzelnen Kinasen sowie dem Wechsel der Kinasen zwischen inaktivem und aktivem Zustand. Essentiell für die meisten dieser dynamischen Ereignisse ist der Zerfall bzw. Aufbau von Protein-Protein-Interaktionen.

In Säugerzellen sind bereits viele verschiedene Interaktionen von MAP3Ks, MAP2Ks und MAPKs mit anderen Proteinen bekannt (DeFea et al., 2000; Tanoue and Nishida, 2003; Bogoyevitch and Kobe, 2006; Fujioka et al., 2006). Auch in Hefe existieren mit den Kaskaden um die MAPKs Fus3, Hog1 und Kss1 bereits gut untersuchte Beispiele (Elion, 2001; Bhattacharyya et al., 2006; Remenyi et al., 2006). Der nächste Schritt nach der Offenlegung von MAPK-Protein-Interaktionen ist deren Charakterisierung durch Ermittlung von Dissoziationskonstanten und Proteinstrukturen sowie detaillierte mikroskopgestützte Untersuchungen (Ando et al., 2004; Marles et al., 2004; Burack and Shaw, 2005; Remenyi et al., 2005; Fujioka et al., 2006; Zheng et al., 2006). Das Wissen über die Zusammenhänge zwischen der Dynamik einzelner Protein-Protein-Interaktionen und der jeweiligen biologischen Aktivität ist ein Schlüssel zum besseren Verständnis der Kontrolle von MAPK-Kaskaden.

Im Vergleich zur Situation in Hefe und tierischen Modellsystemen steht die Untersuchung von MAPK-Kaskaden und den dazugehörigen Regulationsmechanismen in Pflanzen noch am Anfang. Schwerpunkte der Forschung auf diesem Gebiet sind momentan die Offenlegung von MAPK-Kaskaden und die Identifizierung von MAPK-interagierenden Proteinen wie Substrate und Phosphatasen (Ulm et al., 2002; Liu and Zhang, 2004; Teige et al., 2004; Meszaros et al., 2006; Wang et al., 2007)

4.1.1 Erste Informationen über AtMPK3- bzw. AtMPK6-haltige Proteinkomplexe

Eine Grundlage für die direkte Identifizierung von MAPK-assoziierten Proteinen aus dem Milieu der Zellen ist die Isolierung von MAPK-haltigen Proteinkomplexen. Hier konnten mittels Ausschlusschromatographie und Immunoblotanalyse eindeutige Hinweise darauf erhalten werden, dass AtMPK3 und 6 in löslichen Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen mit endogenen, zellulären Proteinen interagierten (Abb. 3.7). In Extrakten aus Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* schienen hingegen nur geringe Mengen von AtMPK3 bzw. 6 in Proteinkomplexen gebunden zu sein (Abb. 3.8 und 3.10). Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in Zellkultur- und Blattmaterial liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Zusammensetzung und Physiologie dieser Materialien. So sind die Zellen in der Zellkultur sehr homogen, enthalten keine ausdifferenzierten Chloroplasten, teilen sich aktiv und ernähren sich heterotroph. In voll ausdifferenzierten Rosettenblättern befinden sich jedoch verschiedene Zelltypen sowie Chloroplasten, welche der Pflanze eine autotrophe Lebensweise ermöglichen.

Eine Aktivierung der MAPKs AtMPK3 und 6 kann zum Beispiel durch Behandlung mit dem Elizitor flg22 bzw. dem Protein NLP_{Ps} erfolgen. Die auf die verschiedenen Behandlungen des Pflanzenmaterials folgenden Reaktionen setzen mit Sicherheit die Auflösung bestehender Protein-Protein-Interaktionen sowie deren Neuformation voraus. Deshalb wurde eine vergleichende Analyse der Elutionsmuster von unbehandeltem und flg22- bzw. NLP_{Ps}-behandeltem Pflanzenmaterial durchgeführt. Mittels Ausschlusschromatographie gefolgt von Immunodetektion gelang es jedoch nicht, für AtMPK3 bzw. 6 Veränderungen auf der Ebene der Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Trotzdem ist es sehr unwahrscheinlich, dass AtMPK3 und 6 permanent in denselben Proteinkomplexen verbleiben. Vielmehr war die angewandte Methode vermutlich nicht geeignet, die dynamischen Veränderungen bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Proteinen vor, während und nach der Aktivierung von AtMPK3 und 6 widerzugeben. Einerseits wurden in diesen chromatographischen Untersuchungen Totalextrakte aus einer größeren Population von Zellen einer behandelten Zellkultur bzw. aus ganzen behandelten Blättern untersucht. Jedoch führte die Behandlung mit flg22 bzw. NLP_{Ps} höchstwahrscheinlich nicht in allen Zellen zu einer Aktivierung aller MAPKs. Dadurch kamen bei der Analyse Zellkultur- bzw. Blattmaterialien zum Einsatz die in bezug auf die MAPK-Aktivierung nicht homogen waren. Diese Mittelung von Reaktionen verschiedener Zellen liefert unter Umständen eine unvollständige Sicht auf die Ereignisse. Andererseits wurden die Zellen während der Probenaufbereitung aufgebrochen und die Trennung von höher- und niedermolekularen Proteinen während der Ausschlusschromato-

graphie erstreckte sich über 90 min. Demzufolge konnten wahrscheinlich mittels Ausschlusschromatographie Hinweise auf relativ stabile AtMPK3- bzw. AtMPK6-haltige Multiproteinkomplexe erhalten werden, aber nicht auf instabile und/oder transiente MAPK-Proteinkomplexe.

In Säugerzellen konnte mittels Ausschlusschromatographie für die MAPKs ERK1 und 2 sowie das Gerüstprotein β -Arrestin der Nachweis erbracht werden, dass diese Proteine nach der Aktivierung der entsprechenden Signalkaskade neue Protein-Protein-Interaktionen eingehen (DeFea et al., 2000). Diese Hinweise für den Aufbau neuer MAPK-Protein-Interaktionen während der Aktivierung einer Signalkaskade wurden allerdings erst im Anschluss an eine Stabilisierung von Proteinkomplexen *in vivo* durch chemisches Vernetzen erhalten. Chemische Vernetzung von transienten und/oder instabilen Proteinkomplexen kam in letzter Zeit auch mehrfach in Studien zum Einsatz, welche die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen basierend auf chromatographischen Trennmethoden und massenspektrometrischer Analytik zum Ziel hatten (Schmitt-Ulms et al., 2004; Vasilescu et al., 2004; Guerrero et al., 2006).

Auch im Rahmen dieser Arbeit kam die chemische Vernetzung von Proteinen zum Einsatz. Ziel war die Stabilisierung von eventuell instabilen Proteinkomplexen, an denen AtMPK3 bzw. AtMPK6 beteiligt sind. Zum einen sollten dadurch eindeutiger Hinweise auf die Anwesenheit von AtMPK3 bzw. 6 in Totalextrakten aus Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* erhalten werden. Zum anderen galt es, die Probenvorbereitung für die affinitätschromatographische Reinigung von AtMPK3 bzw. 6 und putativ mit ihnen assoziierter Proteine zu optimieren. Mit Hilfe der eingesetzten *crosslinker* HCHO und DSP gelang es jedoch nicht AtMPK3 bzw. 6 in nachweisbaren Mengen in Multiproteinkomplexen zu verankern (Abb. 3.14 und 3.15). Für HCHO konnten dennoch Anhaltspunkte erhalten werden, dass abundante Proteine mit anderen Molekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren vernetzt wurden (Abb. 3.14). Die Hypothesen aus diesen Ergebnissen sind folgende: (i) AtMPK3 und/oder 6 lagen in unbehandelten *Arabidopsis thaliana*-Blättern zum überwiegenden Teil als Monomer vor. (ii) Die Seitengruppen der Aminosäuren von AtMPK3 bzw. 6, welche für die chemische Vernetzung mit anderen Proteinen mit Hilfe der hochreaktiven Substanz HCHO benötigt wurden, waren zu weit voneinander entfernt. (iii) Eine *in vivo* stattfindende chemische Vernetzung mittels DSP war nicht möglich, da DSP bereits auf dem Weg in die Zelle mit Proteinen reagierte und/oder nicht in ausreichendem Maße in die Zellen eindringen konnte.

Die Existenz von AtMPK3- bzw. AtMPK6-haltigen Proteinkomplexen in unbehandelten *Arabidopsis thaliana*-Blättern kann mit Blick auf die bisher vorliegenden Ergebnisse weder vollständig bejaht noch vollständig verneint werden. Ferner liegt die Struktur der MAPKs AtMPK3 und 6 nicht vor und könnte lediglich basierend auf den bekannten Strukturen von

MAPKs wie ERK1, Fus3 und Kss1 modelliert werden. Außerdem sind die Proteine, welche möglicherweise mit AtMPK3 oder 6 interagieren nicht bekannt. Daher lassen sich keinerlei Aussagen darüber treffen, ob die für die chemische Vernetzung in Frage kommenden Seitengruppen in den MAPKs und ihren putativen Interaktoren ungünstig positioniert sind oder nicht.

Für die hier vorliegende Problemstellung wären überdies Substanzen wünschenswert, die erst nach der Aufnahme in die Zelle spezifisch mit den Seitenketten der Aminosäuren reagieren. Zudem kann zwar das hochreaktive HCHO problemlos in die Zellen eindringen, die Aufnahme andere membrangängiger *crosslinker* wie DSP in die Pflanzenzelle wird allerdings sehr wahrscheinlich durch die Zellwand gestört. Beide Probleme ließen sich vielleicht mit modifizierten Aminosäuren bewältigen, welche in die Proteine eingebaut werden können und erst nach einer Photoaktivierung zur chemischen Vernetzung von Proteinen führen. So wurden zum Beispiel im Rahmen einer Studie zum *in vivo crosslinking* in Säugerzellen die modifizierten Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin synthetisiert, welche photoaktivierbaren Diazirin-Derivaten entsprechen (Suchanek et al., 2005). Die Aufnahme der Photo-Aminosäuren in die Zellen und deren Einbau in Proteine hatte keine toxischen Nebenwirkungen. Nach einer UV-Behandlung der Zellen erfolgte, vermittelt durch den Diazirinring, die Vernetzung der Proteine. Beispielsweise gelang mit Hilfe der photoaktivierbaren Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin unter anderem die spezifische chemische Vernetzung von Untereinheiten des 19S regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms (Suchanek et al., 2005). Da chemische Vernetzungen, welche auf diese Photo-Aminosäuren zurückgehen, nachträglich nicht gespalten werden können, eignet sich diese Methode nur für die Immunodetektion der stabilisierten Komplexe bzw. für Coimmunfällungen.

Bleibt die Frage nach den Chancen für eine Übertragung der chemischen Vernetzung mittels Photo-Aminosäuren von tierischen auf pflanzliche Zellen. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert für mehr als 50 Aminosäuretransporter, die sich bezüglich der Substratspezifität, des Expressionsmusters sowie der Kontrolle von Aktivität und Expression durch entwicklungs- bzw. umweltspezifische Einflüsse unterscheiden (Liu and Bush, 2006). Inwiefern in den Wurzeln von hydroponisch wachsenden Pflanzen bzw. in Zellsuspensionskulturen exprimierte Aminosäuretransporter in der Lage sind, Photo-Methionin und Photo-Leucin aufzunehmen, müsste in Fütterungsversuchen getestet werden. Bekannt ist, dass *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen mit stabilen Isotopen markierte Aminosäuren wie [²H₃]-Leucin, [¹³C₆]-Arginin und [²H₄]-Lysin aufnehmen und in Proteine einbauen können, wobei die Inkorporation von [¹³C₆]-Arginin in Proteine eine Effizienz von ca. 80% erreicht

(Gruhler et al., 2005). Daraus wird ersichtlich, dass die Fähigkeit der Pflanzenzellen zur Synthese aller Aminosäuren den Einbau von exogen zugegebenen Aminosäuren nicht von vornherein ausschließt. Außerdem wird der Aminosäuretransport in Pflanzen sehr stark von Umweltfaktoren beeinflusst (Liu and Bush, 2006). Es sollte daher untersucht werden, ob die Effizienz der Aufnahme der Photo-Aminosäuren von Umwelteinflüssen wie Licht abhängt. So erfolgte beispielsweise die Fütterung der Zellsuspensionskulturen mit den Isotop-markierten Aminosäuren unter Dauerlicht (Gruhler et al., 2005).

4.1.2 Identifizierung putativer AtMPK3- bzw. AtMPK6-Interaktoren basierend auf der Vorfraktionierung von Totalextrakten

Die direkte Analyse von Totalextrakten würde aufgrund der Komplexität des Proteoms und der in einer Zelle sehr unterschiedlichen Konzentration einzelner Proteine nur die Identifizierung von abundanten Proteinen erlauben. Daher setzt eine gezielte Proteomanalyse oft die Etablierung einer Probenvorbereitung voraus, die für die jeweilige Zielstellung geeignet und gleichzeitig reproduzierbar ist. Ausschlusschromatographie ist eine Möglichkeit, wie komplexe Proteingemische vorfraktioniert werden können. Aufbauend auf der Ausschlusschromatographie von Totalextrakten aus *Arabidopsis thaliana* wurde daher im Rahmen dieser Arbeit ein Arbeitsablauf zur Identifizierung von MAPK-assoziierten Proteinen durch eine vergleichende Proteomanalyse des Wildtyps und der *knock out*-Linien *mpk3* und *mpk6* konzipiert (Abb. 3.11).

Hier wurde die Analyse von Zellkulturextrakten favorisiert, da für Zellsuspensionskulturen eindeutige Hinweise für die Anwesenheit von AtMPK3 und 6 in Proteinkomplexen erbracht werden konnten. Ein Vorversuch ergab allerdings, dass in Zellkulturen große Unterschiede in der Zusammensetzung des Proteoms von Wildtyp- und *knock out*-Linien bestanden. Daher wurde entschieden die Suche nach putativen AtMPK3- bzw. AtMPK6-Interaktoren in Zellkulturmaterial basierend auf Differenzen in der Zusammensetzung der Proteingemische in Abhängigkeit von der Anwesenheit der jeweiligen AtMPK nicht weiter zu verfolgen.

Als Wildtyp kam hier eine etablierte Zellsuspensionskultur von *Arabidopsis thaliana* (Col-0) zum Einsatz. Die verwendeten *knock out*-Zellkulturen waren hingegen erst aus *mpk3*- bzw. *mpk6*-Keimlingen erzeugt wurden, zeigten ein geringeres Wachstum und ließen sich nicht problemlos subkultivieren. Die Verwendung der etablierten Wildtyp-Zellkultur zur Erzeugung der benötigten *knock out*-Zellkulturen wäre eine Möglichkeit, das Problem der verschiedenen zusammengesetzten Proteingemische aus Wildtyp- und *knock out*-Zellkulturlinien zu minimieren. Ein direkter Ansatz wäre die stabile Transformation der Wildtyp-Zellkultur mit einem Vektorsystem, welches in den transformierten Zellen die Abschaltung oder zumindest

Herabregulation der Gene für *AtMPK3* und *AtMPK6* durch RNA-Interferenz bewirkt. Die Mechanismen der RNA-Interferenz werden beispielsweise aktiviert, wenn in Pflanzenzellen unter Verwendung eines starken, konstitutiven Promotors ein *inverted repeat* mit Homologie zum Zielgen exprimiert wird (Horiguchi, 2004).

Protokolle zur stabilen Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskulturen mit Hilfe von *Agrobacterium* liegen bereits vor (Forreiter et al., 1997; Menges and Murray, 2006). Außerdem gelang im Laufe der Experimente zu dieser Dissertation die Transformation einer Zellsuspensionskultur von *Arabidopsis thaliana* (Ler), was die Expression von TAP-markierter AtMPK3 in der Zellkultur ermöglichte.

Vorteilhaft an der Verwendung der Zellkulturen wäre auch, dass in diesem Fall quantitative massenspektrometrische Methoden eingesetzt werden könnten (Gruhler et al., 2005; Benschop et al., 2007). Da die Probenvorbereitung, die Fraktionierung und die MS-Analyse stets einer gewissen biologischen und technischen Varianz unterliegen, ist für die quantitative Analytik eine Vereinigung der zu quantifizierenden Proben vor Beginn der Aufarbeitung optimal (Blagoev and Mann, 2006; Benschop et al., 2007). Eine Unterscheidung der gemischten Proben ist möglich, wenn eine der zu vergleichenden Zelllinien vorher mit einem nicht-radioaktivem schweren Isotop wie ^{13}C oder ^{15}N gefüttert wird. Diese schweren Isotope können entweder als Teil von Aminosäuren (z.B. [$^{13}\text{C}_6$]-Arginin) oder als Salze (z.B. K^{15}NO_3 oder [$^{15}\text{NH}_4$] $_2\text{SO}_4$) dem Basalmedium zugegeben werden (Gruhler et al., 2005; Blagoev and Mann, 2006; Benschop et al., 2007). Studien zeigten, dass in *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen die Markierung der Proteine mit schweren Isotopen durch Zugabe von Salzen zum Medium zu einer nahezu vollständigen Inkorporation in zufällig ausgewählte Proteine führte (Benschop et al., 2007). Im MS-Spektrum erscheinen die durch proteolytischen Verdau erhaltenen Isotop-markierten sowie die unmarkierten Peptiden als Peptidpaare, die sich um die durch die Isotop-Markierung verursachte Massendifferenz unterscheiden. Basierend auf dem MS-Spektrum kann der Quotient aus ^{14}N und ^{15}N markierten Peptiden bestimmt werden. Proteine, die als unspezifischer Hintergrund klassifiziert werden, haben einen Quotienten zwischen 0,7 und 1,5 (Guerrero et al., 2006; Benschop et al., 2007).

4.2 Analyse von AtMPK3 und eventuell assoziierten Proteinen basierend auf Affinitätschromatographie

4.2.1 Wie effizient sollte eine Tandemaffinitätsreinigung sein?

Die Tandemaffinitätsreinigung stellt mittlerweile sowohl in klassischer als auch abgewandelter Form eine weit verbreitete Methode zur Präparation von Proteinkomplexen für die massenspektrometrische Analyse dar (Rigaut et al., 1999; Knuesel et al., 2003; Kaneko et al., 2004;

Burckstummer et al., 2006; Guerrero et al., 2006; Rohila et al., 2006). Genaue Angaben zur Effizienz der jeweiligen Aufreinigungen der verschiedenen Proteine aus verschiedenen Modellorganismen findet man aber selten. Die Entwickler der klassischen TAP-Methode schätzten die Ausbeute an TAP-markiertem Protein in nicht gezeigten Vorversuchen auf etwa 20 bis 30% des ursprünglich im Gesamtextrakt enthaltenen TAP-markierten Proteins (S raphin et al., 2002). Ein Protokoll zur konventionellen Tandemaffinitätsreinigung von Proteinen aus Säugerzellen für die direkte Analyse mittels LC-MS empfiehlt eine Optimierung der Methode bei Ausbeuten unter 30% (<http://www.proteomecenter.org/protocols/Mammalian%20TAP%20protocols.pdf>; 05.03.2007). Im Gegensatz dazu ergab eine Quantifizierung von Proteinen aus Säugerzellen, die mit einem modifizierten TAP-Verfahren aufgereinigt wurden, eine Ausbeute von 5% (Burckstummer et al., 2006). Die Daten zur Quantifizierung aus der Studie von Burckstummer et al. (2006) beruhen auf einer vergleichenden Immunoblotanalyse von rekombinantem Köderprotein vor und nach dem Protease-Verdau mit dem Totalextrakt bzw. dem letztem Eluat. Folglich konnten bezüglich der eingesetzten Proteinmengen genaue Angaben gemacht werden. Für die Reinigung wurden 35 mg Gesamtproteinextrakt eingesetzt, die 700 pmol (entspricht 70 µg) des markierten Köderproteins IKK  enthielten. Im letzten Eluat befanden sich hingegen noch 35 pmol IKK  (entspricht 2 µg). Zudem wurde darauf verwiesen, dass die modifizierte TAP-Methode die Ausbeute an Köderprotein im Vergleich zur klassischen TAP-Technologie um etwa das Zehnfache verbesserte (Burckstummer et al., 2006). Einer Gesamtausbeute an aufgereinigtem Protein nach der klassischen TAP-Methode von weniger als einem Prozent (Burckstummer et al., 2006) steht also eine gesch tzte Ausbeute von 20 bis 30% gegenüber (S raphin et al., 2002) (<http://www.proteomecenter.org/protocols/Mammalian%20TAP%20protocols.pdf>; 05.03.2007). In Abhängigkeit vom stöchiometrischen Verhältnis des Köderproteins zu den mit ihm interagierenden Proteinen kommt es bezüglich der Interaktoren zu einer unterschiedlich starken Anreicherung. Liegen am Ende der Aufreinigung also 35 pmol des Köderproteins vor und beträgt das Verhältnis Köder zu Interaktor 2:1 bzw. 1:20, so ist mit einer Ausbeute an interagierenden Proteinen von 70 bzw. 1,5 pmol zu rechnen (Burckstummer et al., 2006). In beiden Fällen kann das Protein mit Silberfärbung detektiert und mittels LC gekoppelt mit MS/MS analysiert werden (Burckstummer et al., 2006; Miller et al., 2006).

Für Pflanzen sind nur für die modifizierte Tandemaffinitätsreinigung des Proteins AtCSN3 Daten verfügbar, die in Ansätzen eine Quantifizierung erlauben (Rubio et al., 2005). Wie in der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Reinigungsschritte mittels Immunoblotanalyse untersucht. Zwar traten auch bei der Reinigung von AtCSN3 Verluste auf, jedoch waren diese Verluste stets geringer als die hier beobachteten Verluste an AtMPK3-Protein. In der Studie

von Rubio et al. (2005) und in der vorliegenden Arbeit wurden relativ betrachtet stets etwa viermal mehr Probe vom zweiten Eluat als vom Totalextrakt analysiert. Trotzdem konnte im Vergleich zum jeweiligen Totalextrakt im zweiten Eluat wesentlich mehr AtCSN3 als AtMPK3 immunologisch nachgewiesen werden. Ein im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Vergleich der Tandemaffinitätsreinigungen von AtMPK3 und AtTGA2 offenbarte, dass die optimierte Aufreinigung von AtTGA2 ebenfalls effizienter ist als die von AtMPK3.

4.2.2 Mögliche Ursachen für die ineffiziente Aufreinigung von AtMPK3-TAP

Trotz umfangreicher Versuche (siehe Kapitel 3.4.2.2) konnte eine Optimierung der Aufreinigung von AtMPK3-TAP und eine damit einhergehende Verbesserung der Effizienz der Reinigung im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden. Daher gelang in der vorliegenden Arbeit mittels MALDI-TOF MS zwar eine Identifizierung der niedrig abundanten MAPK AtMPK3 im Anschluss an die Affinitätschromatographische Reinigung, jedoch nicht die Identifizierung von putativen AtMPK3-Interaktoren.

Aus einem Vergleich der Reinigungseffizienzen von AtMPK3-TAP und dem Transkriptionsfaktor AtTGA2-TAP wurde deutlich, dass die Verluste an AtMPK3-Protein größer sind als an AtTGA2-Protein. Somit geht die geringe Effizienz der AtMPK3-Aufreinigung zumindest zum Teil auf ein für dieses Protein spezifisches Problem zurück. Außerdem war die Isolierung von AtMPK3 sowohl in einer einstufigen als auch in einer zweistufigen Affinitätschromatographie mit großen Verlusten verbunden.

Zudem konnte mit Hilfe verschiedener Versuche nicht geklärt werden, ob der große Verlust an AtMPK3-Protein auf eine Adsorption an die verwendeten Materialien und/oder auf eine Proteolyse zurückzuführen war. Die Bindung von Proteinen an Kunststoffoberflächen wird durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufen. Im ungünstigsten Fall wird die Adsorption durch die Aufreinigung eines Proteins gefördert, da während der Affinitätsreinigung die Proteine zuerst an eine Matrix gebunden und nach dem Wegwaschen von Verunreinigungen durch Elution wieder freigesetzt werden. Das daraus resultierende Eluat enthält im Vergleich zum Ausgangsmaterial noch wenige Proteine, die mit Plastikoberflächen Wechselwirkungen eingehen können. Daher könnte die aufgereinigte AtMPK3 unter Umständen verstärkt an Trägermaterialien adsorbieren. Versuche, derartige Verluste durch den Einsatz spezieller *LoBind*-Reaktionsgefäße von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zu reduzieren, schlugen fehl.

Der Abbau von Proteinen wird von Proteasen (auch Peptidasen genannt) katalysiert. Bei der Klassifizierung der Proteasen erfolgt eine Unterscheidung zwischen Exo- und Endopeptidasen (Tab. 4.1). Exopeptidasen spalten nur Peptidbindungen am N- oder C-Terminus eines Proteins,

wobei als Produkte einzelne Aminosäuren oder Di- bzw. Tripeptide entstehen (Tab. 4.1). Endopeptidasen hingegen greifen das Substrat innerhalb des Moleküls an und sind meist auf spezifische Erkennungssequenzen angewiesen.

Zuerst wurde untersucht, ob die bei der Reinigung eingesetzte Endopeptidase des *tobacco etch virus* (TEV-Protease) eine Hydrolyse von AtMPK3 verursacht. Durch eine Sequenzanalyse von AtMPK3 konnte das Vorliegen einer Schnittstelle für die TEV-Protease ausgeschlossen werden. Außerdem führte die Inkubation von rekombinantem AtMPK3-Protein mit einem zehnfachen Überschuss an TEV-Protease nicht zum Verdau von AtMPK3.

Tab. 4.1 Überblick über die Klassifizierung der Proteasen in Anlehnung an die Datenbank des *Expasy Proteomics Servers* (<http://www.expasy.org/enzyme/>; 04.03.2007).

	Proteasentyp	katalysierte Reaktion
Exopeptidasen	Aminopeptidasen	Abspaltung einzelner Aminosäuren vom N-Terminus
	Dipeptidasen	Spaltung von Dipeptiden
	Dipeptidyl-Peptidasen und Tripeptidyl-Peptidasen	Abspaltung N-terminaler Di- bzw. Tripeptide
	Peptidyl-Dipeptidasen	Abspaltung C-terminaler Dipeptide
	Serin-Typ Carboxypeptidasen Metallocoarboxypeptidasen Cystein-Typ Carboxypeptidasen	Abspaltung einzelner Aminosäuren vom C-Terminus, Unterteilung basiert auf dem Aufbau des aktiven Zentrums
	Omega-Peptidasen	Abspaltung einzelner N-Formyl- oder N-Acetyl-Aminosäuren vom N-Terminus
Endopeptidasen	Serinpeptidasen	
	Cysteinpeptidasen	Hydrolyse von Peptidbindungen innerhalb des Substrats
	Aspartatpeptidasen	Unterteilung basiert auf dem Aufbau des aktiven Zentrums
	Metallopeptidasen	
	Threoninpeptidasen	

Das ein allein durch Exopeptidasen katalysierter Abbau von markierter AtMPK3, die Ursache für die ineffiziente Aufreinigung sein könnte, ist unwahrscheinlich. Problematischer wäre die Co-Aufreinigung einer Endopeptidase aus *Arabidopsis thaliana*, welche während des TEV-Protease-Verdaus von AtMPK3-TAP aktiv ist. Eine Co-Aufreinigung einer Protease im Zuge einer Tandemaffinitätsreinigung wurde bereits von Rohila et al. (2004) beschrieben, wobei die in diesem Fall offenbar mit angereicherte *Arabidopsis thaliana*-Protease durch den Cysteinprotease-Inhibitor E-64 gehemmt werden konnte. Insgesamt wurden im Genom von *Arabidopsis thaliana* bisher mehr als 600 für Proteasen kodierende Gene identifiziert (Schaller, 2004; Rawlings et al., 2006).

Da die TEV-Protease gegenüber verschiedenen häufig verwendeten Proteasehemmern wie PMSF, Pepstatin A und E-64 resistent ist, können diese Inhibitoren während der Spaltung der

TAP-Markierung zugegeben werden (http://mc11.ncifcrf.gov/qa_tech/faq/tev.pdf; 05.06.2006). Ursache für diese Resistenz ist wahrscheinlich, dass die TEV-Protease zwar eine Struktur ähnlich zur Serinpeptidase Chymotrypsin aufweist, aber anstelle des Serins in der katalytischen Triade ein Cystein besitzt (Phan et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den folgenden Inhibitoren versucht, die während der Reinigung der TAP-markierten AtMPK3 auftretenden Verluste zu reduzieren: (i) 1 mM PMSF; (ii) Roche Protease-Inhibitormix (*complete*, EDTA frei) und (iii) Sigma *Protease Inhibitor Cocktail* für Extrakte aus Pflanzenmaterial. Im Falle von PMSF handelt es sich um einen Serinprotease-Hemmer. Die Zusammensetzung des Inhibitorgemisches von Roche ist nicht bekannt. Jedoch werden laut Roche die Serinpeptidasen Chymotrypsin und Trypsin sowie die Cysteinpeptidase Papain sehr effektiv gehemmt. Über den Inhibitormix von Sigma ist bekannt, dass er Inhibitoren gegen Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen enthält. Die Inhibitormischung von Sigma hatte somit das breiteste Wirkungsspektrum. Beim Vergleich mit Tabelle 4.1 wird offensichtlich, dass aus der Gruppe der Endopeptidasen nur die Threoninpeptidasen mit keinem der eingesetzten Inhibitoren gehemmt werden können. Trotz der Vielfalt der eingesetzten Proteaseinhibitoren konnte die Effizienz der AtMPK3-Reinigung nicht verbessert werden. Daher wurden die hohen Verluste an AtMPK3-Protein entweder nicht durch eine co-aufgereinigte Protease verursacht oder eine eventuell mit angereicherte Protease konnte durch die verwendeten Inhibitoren nicht gehemmt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die normalerweise verwendete Konzentration der Inhibitoren für eine Hemmung einer unter Umständen mit angereicherten Protease zu niedrig war.

4.2.3 Mögliche Anpassungen in der Handhabung und der Analyse der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proben

Eine ineffiziente Anreicherung des Köderproteins AtMPK3 resultiert auch in einer ineffizienten Anreicherung putativer AtMPK3-Interaktoren. Gleichzeitig liegt wahrscheinlich ein nicht unerheblicher Anteil von AtMPK3-Protein als Monomer vor und die AtMPK3-haltigen Proteinkomplexe weisen eine geringe Stöchiometrie bezüglich der putativen Interaktoren auf. Neben der suboptimalen Aufreinigung führen diese Faktoren zu einer weiteren Reduktion der maximal möglichen Ausbeute an mit AtMPK3 assoziierten Proteinen. Daher sind die verbleibenden Chancen für eine erfolgreiche Isolierung und Identifizierung von Interaktoren der AtMPK3 mit Hilfe von Affinitätschromatographie gering. Erleichtert werden würde eine Lösung der Probleme allerdings, wenn die Verluste fast ausschließlich durch die Adsorption von AtMPK3 an die verwendeten Materialien verursacht würden und/oder eine hochsensitive Analytik der aufgereinigten Proteingemische durchgeführt werden könnte. Wie

im Fall der verstärkten Adsorption von AtMPK3 durch Anpassungen in der Handhabung und der Analyse der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proben eventuell noch Ergebnisse erhalten werden könnten, ist in Abbildung 4.1 B gezeigt und soll im Folgenden näher beschrieben werden.

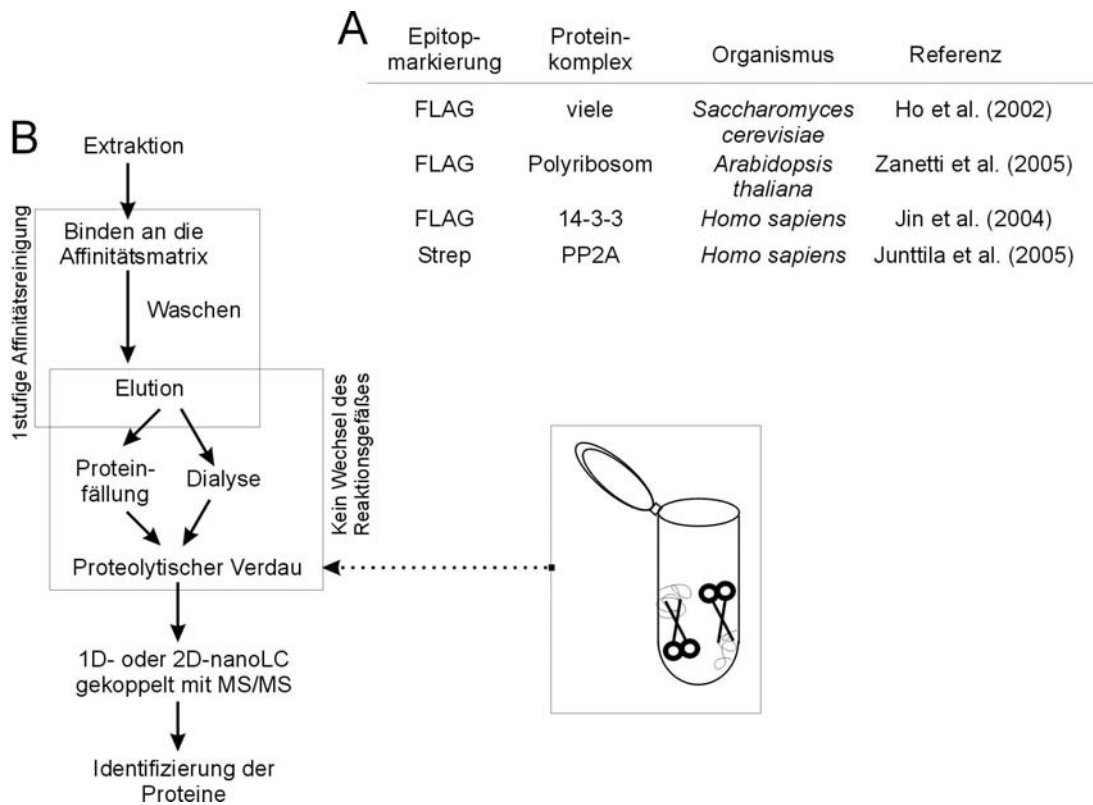


Abb. 4.1 Anpassungen in der Handhabung und der Analyse der durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proben. **(A)** Beispiele für die erfolgreiche Isolierung und Identifizierung von interagierenden Proteinen mittels einstufiger Affinitätsreinigung. **(B)** Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs der einstufigen Affinitätsreinigung und der Analyse der Eluate.

In einem ersten Schritt könnte versucht werden, die Verluste an AtMPK3 durch eine Reduktion der Anzahl der Reinigungsschritte mittels eines Übergangs von der zweistufigen TAP-Methode zu einer einstufigen Affinitätschromatographie zu reduzieren (Abb. 4.1 B). Obwohl zweistufige Affinitätsreinigungen wie die TAP-Methode zu einem höheren Reinheitsgrad der Zielproteine führen (Rigaut et al., 1999; Kaneko et al., 2004), gelang bisher in einigen Fällen auch die Isolierung und Identifizierung von interagierenden Proteinen mittels einer einstufigen Affinitätsreinigung (Ho et al., 2002; Jin et al., 2004; Junttila et al., 2005; Zanetti et al., 2005) (Abb. 4.1 A). Am häufigsten zum Einsatz kam dabei die FLAG-Markierung, welche aus einem kurzen, hydrophilen, acht Aminosäuren umfassenden Peptid besteht (Terpe, 2003; Chang, 2006). So ermöglichte ein auf der FLAG-Markierung beruhender Ansatz zur Affinitätsreinigung von vielen verschiedenen Proteinkomplexen in *Saccharomyces*

cerevisiae die Erstellung von Protein-Protein-Interaktionskarten (Ho et al., 2002). In *Arabidopsis thaliana* gelang mit Hilfe der FLAG-Affinitätschromatographie die Isolierung von Polyribosomen inklusive der (putativen) cytosolischen ribosomalen Proteine, der mit Ribosomen assoziierten Proteine und verschiedener Transkripte (Zanetti et al., 2005). Auch in Säugerzellen wurde eine Affinitätsreinigung basierend auf dem Strep-Tag etabliert (Junttila et al., 2005). Dabei ergab ein Vergleich der Aufreinigungen mit einer Strep- bzw. TAP-markierten Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, dass in beiden Fällen die gleichen putativen Interaktoren identifiziert werden konnten. Ebenso führte die Aufreinigung des Proteins SGT1b aus *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe der Strep-Markierung zu einer ähnlichen Ausbeute und einem ähnlichen Reinheitsgrad wie die Aufreinigung von SGT1b mit der TAP-Methode (Witte et al., 2004). Das heißt mit der einstufigen Strep-Reinigung wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit der zweistufigen TAP-Methode.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bereits nach dem ersten Schritt der Tandemaffinitätsaufreinigung zu einer deutlichen Anreicherung der in der Vektorkontrolle exprimierten TAP-Markierung kam. Im Gegensatz dazu schlug die Anreicherung der AtMPK3-TAP durch eine auf der TAP-Markierung beruhende einstufige Affinitätschromatographie fehl. Wie bereits diskutiert, konnten die Ursachen für das Fehlschlagen der Anreicherung von markierter AtMPK3 hier nicht geklärt werden. Sollten die Verluste allerdings zum größten Teil auf einer Adsorption von AtMPK3 an Kunststoffoberflächen beruhen, wäre eine Identifizierung von AtMPK3 und putativ mit ihr assoziierter Proteine basierend auf einer Analyse ohne Verwendung von Proteingelen noch möglich. Um Verluste zu vermeiden müsste der proteolytische Verdau der aufgereinigten Proteine im selben Reaktionsgefäß durchgeführt werden wie die Elution (Abb. 4.1 B). Da Proteine im nativen Zustand höchst unwahrscheinlich in vollständig entfalteter Form an Trägermaterialien binden, sollte die für den Verdau eingesetzte Protease in der Lage sein, Teile des Proteins als Peptide in Lösung zu bringen. Die für die einstufigen Affinitätsreinigungen verwendeten Elutionspuffer unterscheiden sich in der Regel jedoch deutlich von den Protease-Verdaupuffern und ermöglichen somit keinen optimalen Verdau der aufgereinigten Proteine. Daher sollte vor dem proteolytischen Verdau ein Pufferwechsel erfolgen (Abb. 4.1). Wegen des Zwangs zur Durchführung von Elution und Protease-Verdau im selben Reaktionsgefäß kann als Verfahren für einen Pufferaustausch nur Dialyse in Betracht gezogen werden. Infolgedessen müsste das Eluat direkt im Dialysegefäß (z.B. Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Units von PIERCE, IL, USA) aufgefangen, gegen Verdaupuffer dialysiert und die Proteine anschließend im Dialysegefäß proteolytisch verdaut werden. Die erhaltenen Peptidgemische

könnten anschließend mittels 1D- oder 2D-nanoLC gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie untersucht werden.

Somit könnten Proteine mit einer Affinität zu den verwendeten Materialien in Form ihrer Proteolyseprodukte analysiert werden. Falls die Ursache für die geringe Reinigungseffizienz von AtMPK3 in der Adsorption an die verwendeten Materialien liegt, sollte der dargestellte Ansatz die Aussagefähigkeit derartiger Untersuchungen unter Einbeziehung geeigneter Kontrollexperimente und biologischer Replikate deutlich verbessern.

4.2.4 Die Analyse von Proteingemischen aus Affinitätsreinigungen

Andere Kinasen außer MAPKs bzw. MAPKs aus anderen Modellsystemen und die jeweiligen Interaktoren konnten in der Vergangenheit erfolgreich mittels einstufiger oder zweistufiger Affinitätschromatographie aufgereinigt und identifiziert werden (Gavin et al., 2002; Martin-Yken et al., 2003; Basmaji et al., 2006; Rohila et al., 2006). Daher ist offen inwieweit andere MAPKs oder andere Proteine aus MAPK-Modulen von *Arabidopsis thaliana* in affinitätschromatographischen Verfahren so effizient angereichert werden könnten, dass eine Identifizierung der jeweils mit den Köderproteinen assoziierten Proteine möglich ist.

Mit Blick auf die mittlerweile recht umfangreiche Literatur über Affinitätsreinigung von Proteinen gekoppelt mit Massenspektrometrie lassen sich jedoch folgende Feststellungen bezüglich der Analytik treffen: (i) Im Gegensatz zur ersten Hochdurchsatzanalyse von Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae* mittels der TAP-Technologie erfolgt die massenspektrometrische Analyse der aufgereinigten Proteine nach der Gelelektrophorese meist mit MS/MS oder LC-MS/MS (Rohila et al., 2004; Rubio et al., 2005; Burckstummer et al., 2006; Rohila et al., 2006). Zunehmende Verbreitung findet auch die direkte Analyse der aufgereinigten Proteine durch mehrdimensionale LC *on line* mit MS/MS (Graumann et al., 2004; Benzinger et al., 2005; Koch et al., 2007). (ii) Die Sensitivität der MS-Analyse und die Qualität der sich anschließenden Analyse der MS-Daten entscheidet maßgeblich über die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung von wahrhaft mit dem Köderprotein interagierenden Proteinen.

Bezüglich der Unterscheidung zwischen guten Kandidaten für eine Interaktion mit dem Köderprotein und den Kontaminanten kamen bisher verschiedene Strategien zum Einsatz. Einerseits ermöglicht die parallele Aufreinigung von verschiedenen Köderproteinen mit derselben Methode eine Identifizierung von Proteinen, die regelmäßig im Eluat erscheinen (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002; Graumann et al., 2004; Rohila et al., 2006). Bei diesen Proteinen handelt es sich in den meisten Fällen wahrscheinlich um unspezifisch angereicherte Proteine. Für diese Strategie ist es allerdings vorteilhaft, wenn die parallel aufgereinigten

Köderproteine nicht zu einer Gruppe von Proteinen gehören, welche in der Zelle an den gleichen Prozessen beteiligt sind (z.B. Transkription). Die Analyse von derartig befangenen Datensets erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass einige der richtigen Interaktoren fälschlicherweise ausgeschlossen werden (Graumann et al., 2004). Andererseits kann eine Liste mit Proteinen erstellt werden, die aus der Aufreinigung verschiedener Zellmaterialien mit unterschiedlichen Affinitätsmatrizen resultiert. Auf diese Weise lassen sich Proteine identifizieren, welche eine generelle Affinität zu den in der Regel für chromatographische Proteinreinigungen verwendeten Trägermaterialien haben (Burckstummer et al., 2006).

Es bleibt zu klären, ob eine nach den hier diskutierten Gesichtspunkten optimierte LC-MS-basierte Analyse der Proteingemische, die durch Aufreinigungen des Köderproteins AtMPK3 erhalten wurden, noch zu einer Identifizierung von putativ mit AtMPK3 assoziierten Proteinen führt.

4.3 Chancen und Grenzen der genetisch-basierten Analytik am Beispiel der funktionellen Analyse von AtMPK3

Nach einer umfassenden funktionellen Analyse sollte die Einordnung von AtMPK3 in verschiedene MAPK-Kaskaden sowie die Identifizierung der Regulatoren und Substrate von AtMPK3 möglich sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die MAPK AtMPK3 und eventuell mit ihr assoziierte Proteine mittels Tandemaffinitätsreinigung angereichert werden. Durch den Einsatz von eindimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF MS-Analyse konnten jedoch nur Hinweise auf die Anwesenheit von AtMPK3 erhalten werden. Zudem war die Reinigung ineffizient, da es zu keiner deutlichen Anreicherung von AtMPK3 gegenüber den auch in der Kontrolle noch vorhandenen Proteinen kam. Sollten auch nach einer Optimierung der MS-basierten Analytik keine Hinweise auf putativ mit AtMPK3 assoziierten Proteinen vorliegen, stellt sich die Frage nach weiteren experimentellen Ansätzen für eine tiefgründige funktionelle Untersuchung von AtMPK3. Da auch über andere MAPKs aus *Arabidopsis thaliana* nicht viel mehr oder gar noch weniger über ihre Rolle im Signalnetzwerk bekannt ist, wären alternative experimentelle Ansätze auch für die Untersuchung der MAPKs neben AtMPK3 interessant.

Die bisher bekannten Daten zur funktionellen Charakterisierung von AtMPK3 basieren auf einer Hefe-2-Hybridanalyse, einem Protein-Array und Aktivitätstests (Feilner et al., 2005; Nakagami et al., 2005)(J. Uhrig, Daten unveröffentlicht). Weiterhin existieren Ansätze zur Einordnung von AtMPK3 in Signalnetzwerke basierend auf genetischen Methoden (Asai et al., 2002; Wang et al., 2007). Eine mit Hilfe von genetischen Methoden erzielte Eliminierung, Reduktion oder Änderung der Genfunktion von *AtMPK3* kann sowohl auf der

makroskopischen als auch auf der molekularen Ebene einen Phänotyp verursachen. Für die Charakterisierung des molekularen Phänotyps können so verschiedene Technologien wie cDNA-Microarrays oder die massenspektrometrische Analyse des Proteoms und des Metaboloms eingesetzt werden. Auf Proteinebene werden dann auch alle posttranskriptional und posttranslational aufgetretenen Veränderungen erfasst. Erst die sorgfältige Analyse des nach dem Einsatz genetischer Methoden erhaltenen Phänotyps mittels vielfältiger Techniken ermöglicht letztendlich eine funktionelle Charakterisierung von AtMPK3.

Um die Auswirkungen von Mutationen in Proteinkinasen besser verstehen zu können, muss jedoch auf das bisher vorhandene Wissen über die allgemeinen Funktions- und Regulationsmechanismen der Proteinkinasen zurückgegriffen werden (Madhani, 2006). Offensichtlich wird dies unter anderem durch die folgenden Merkmale von Proteinkinasen (Madhani, 2006): (i) Kinasen können sowohl in inaktiver als auch in aktiver Form vorliegen. (ii) Der enzymatisch inaktive Zustand kann kinaseunabhängige Funktionen haben. (iii) Die Aktivierung von Kinasen resultiert in einigen Fällen aus der Inaktivierung einer autoinhibitorischen Domäne. (iv) Die meisten Proteinkinasen phosphorylieren eine Vielzahl an Substraten, wobei die Spezifität der Aktivierung zum Teil durch assoziierte Proteine kontrolliert wird.

Infolgedessen kann die Abschaltung eines Gens nur erste Hinweise über deren Funktion und Regulation geben (Madhani, 2006). Genauere Informationen lassen sich hingegen durch eine gezielte Eliminierung spezifischer Funktionen und Interaktionen beispielsweise durch die Einführung von Punktmutationen sammeln. Dies erfordert jedoch eine systematische Analyse der Auswirkungen von Mutationen einzelner Aminosäurereste. Zudem kann sich der Phänotyp einer Deletionsmutante signifikant von einem Phänotyp unterscheiden, der aus einer Punktmutation im Protein resultiert (Madhani, 2006).

Im Allgemeinen stammt ein großer Teil des heutigen Wissens über die Funktion von Proteinkinasen in Eukaryoten aus Analysen, die auf der Abschaltung von Genen durch Mutagenese oder RNA-Interferenz (RNAi) beruhen (Madhani, 2006). So wurden mittels Mutagenese oder RNA-Interferenz in *Arabidopsis thaliana* bisher nicht nur Gendefekte in der MAPK AtMPK3 sondern auch in anderen Vertretern aus den Familien der MAP3Ks, MAP2Ks und MAPKs untersucht (Menke et al., 2004; Teige et al., 2004; Miles et al., 2005; Ichimura et al., 2006; Meszaros et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007; Wang et al., 2007).

Prinzipiell kann die geschickte Kombination von Experimenten mit *loss-of-function* sowie *gain-of-function* Mutanten zu einer Einordnung von Kandidatengenen in ein Signalnetzwerk führen. So gelang beispielsweise auch die Offenlegung einer vollständigen MAPK-Kaskade in *Arabidopsis thaliana*, an der AtMPK3 beteiligt ist (Wang et al., 2007). Dabei wurde die

Eliminierung bzw. Reduktion der Genfunktion der einzelnen untersuchten MAP3Ks, MAP2Ks und MAPKs mittels T-DNA-Insertionsmutagenese und RNAi erreicht. Eine Verstärkung der Genfunktion erfolgte hingegen durch Aminosäureaustausche in der Aktivierungsschleife der MAP2Ks sowie durch Deletion der regulatorischen Domäne der MAP3K (Wang et al., 2007). In beiden Fällen kommt es zur konstitutiven Aktivierung der mutierten MAP2K bzw. MAP3K. Die Eliminierung einer Genfunktion führt aufgrund von Redundanz in der eigenen Kinasefamilie und/oder parallelen Signalwegen allerdings nicht zwangsläufig zur Ausprägung eines Phänotyps (Ludwig et al., 2005). Im Gegensatz dazu kann die Untersuchung der Funktion und Regulation von Proteinkinasen basierend auf genetischen Methoden auch durch den letalen Effekt der Abschaltung eines Gens behindert werden. Dementsprechend konnten in *Arabidopsis thaliana* für Einzelmutationen sowohl fehlende morphologische Phänotypen (z.B. AtMPK3 und 6) (Miles et al., 2005; Nakagami et al., 2006; Wang et al., 2007) als auch schwerwiegende Defizite (z.B. AtMEKK1) beobachtet werden. Tiefergehende Untersuchungen der morphologisch unauffälligen *mpk3*- bzw. *mpk6*-Linie legten jedoch auch in diesen Mutanten verschiedene Abweichungen des molekularen Phänotyps der Mutanten vom Wildtyp offen (Menke et al., 2004; Miles et al., 2005). Zudem ist bekannt, dass eine Doppelmutante aus *mpk3* und *mpk6* embryoletal ist (Wang et al., 2007) (Abb. 4.2). Unbekannte Funktionen von AtMPK3 ließen sich somit durch eine Umgehung der Embryoletalität der Doppelnullmutante *mpk3/mpk6* erschließen.

RNAi ermöglicht in Pflanzen neben der gezielten Manipulation einzelner Gene sowohl die simultane Eliminierung bzw. Reduktion der Genfunktion von mehreren Mitgliedern einer Multigenfamilie (Miki et al., 2005) als auch die induzierbare Abschaltung eines Gens in verschiedenen Entwicklungsstadien (Guo et al., 2003; Wielopolska et al., 2005). Infolgedessen kommt induzierbare RNA-Interferenz für eine Abschaltung oder Reduktion der Genfunktion von *AtMPK3* bzw. *AtMPK6* in verschiedenen Entwicklungsstadien in Frage und könnte somit durch eine Umgehung der Embryoletalität von *mpk3/mpk6*-Doppelmutanten neue Funktionen von AtMPK3 offen legen (Abb. 4.2).

Bisher konnten in *Arabidopsis thaliana* zwei chemisch induzierbare Systeme für *RNA silencing* etabliert werden. Die zeitliche Koordinierung des *RNA silencing* erfolgt dabei entweder durch ein 17 β -Östradiol-System gekoppelt mit einer durch Cre/*loxP*-vermittelten Rekombination oder durch ein Dexamethason-abhängiges System (Guo et al., 2003; Wielopolska et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der aus dem *Silencing* resultierende Phänotyp im 17 β -Östradiol-System 6 bis 9 Tage nach der Induktion und im Dexamethason-abhängigen System nach 24 h sichtbar wird. Diese zeitlichen Differenzen lassen sich mit den unterschiedlichen Induktionssystemen begründen. Im 17 β -Östradiol-System bewirkt die

Applikation von 17β -Östradiol die Expression einer Cre-Rekombinase, welche dann ein von den *loxP*-Stellen flankiertes DNA-Fragment ausschneidet (Guo et al., 2003). Nach der Entfernung des DNA-Fragments ist schließlich die Expression der invertierten Sequenzwiederholungen möglich, welche den RNAi-Effekt induzieren. Im Gegensatz dazu wird die Expression einer RNAi-induzierenden *hairpin*-RNA im Dexamethason-abhängigen System direkt durch Dexamethason vermittelt (Wielopolska et al., 2005). Diese technischen Unterschiede haben auch zur Folge, dass RNAi im 17β -Östradiol-System dauerhaft und im Dexamethason-System nur während der Anwesenheit von Dexamethason induziert wird (Guo et al., 2003; Wielopolska et al., 2005).

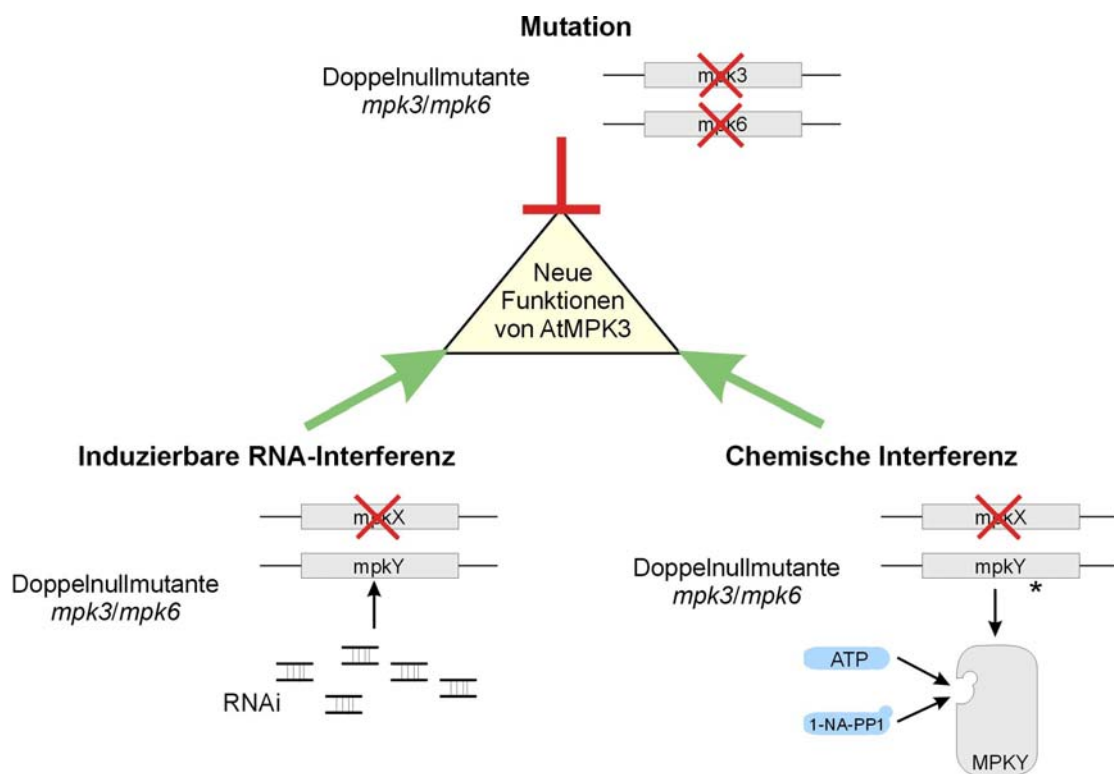


Abb. 4.2 Offenlegung von neuen Funktionen der AtMPK3 durch Kombination von klassischer Nullmutantenanalyse, induzierbarer RNA-Interferenz (RNAi) und chemischer Interferenz. Der klassischen Mutantenanalyse sind in diesem Fall Grenzen gesetzt, da Pflanzen mit einem *mpk3/mpk6*-Genotyp embryonal sind. Die Embryonalität könnte vermieden werden, wenn in Einzelmutanten das jeweils noch intakte Gen oder Genprodukt in verschiedenen Entwicklungsstadien gezielt abgeschaltet würde. Im Falle der induzierbaren RNAi käme es zum Abbau des Transkripts eines Wildtyp-Gens. Die chemische Interferenz erfordert im Vorfeld die Einführung einer funktionell stillen Punktmutation (*) in der Aminosäuresequenz der zu hemmenden MAPK. Dadurch würde die ATP-Bindetasche erweitert und die Kinase könnte durch 1-Naphthyl-PP1 (1-NA-PP1) gehemmt werden.

In Ergänzung zu den mittlerweile klassischen genetischen Methoden der Mutagenese und der RNA-Interferenz gibt es erste Ansätze zur Untersuchung von biologischen Systemen mittels chemischer anstelle von genetischer Intervention (Spring, 2005). Das Konzept der chemischen Genetik basiert auf der spezifischen chemischen Blockade eines Genprodukts und damit zum Beispiel auch eines Signalweges durch Zugabe von kleinen, zellpermeablen Molekülen.

Klarer Vorteil einer Untersuchung basierend auf chemisch-genetischen Methoden ist die schnelle, oft reversible Wirkung einzelner Inhibitoren (Spring, 2005). Dadurch eröffnet sich die Chance, Kinasen während einer entwicklungs- oder umweltbedingten Aktivierung zu manipulieren. Das größte Hindernis für eine breite Anwendung der Inhibitor-gestützten Analyse ist allerdings die geringe Anzahl an Proteinen, für die man einen geeigneten Liganden kennt. Zusätzlich wird eine spezifische Hemmung dadurch erschwert, dass zwischen einzelnen Proteinkinasen hohe Homologien bestehen.

In verschiedene Kinasen (unter anderem den MAPKs ERK2, JNK2, p38 α und Fus3) konnten jedoch bereits Mutationen an der ATP-Bindetasche vorgenommen werden, welche die Funktion nicht eliminierten und gleichzeitig die Sensibilisierung gegen den Inhibitor 1-Naphthyl-PP1 bewirkten (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2001; Carroll et al., 2001; Zhang et al., 2005) (Abb. 4.2). Für Kinasen aus Pflanzen wurde diese Strategie bisher am Beispiel einer Kalzium-abhängigen Proteinkinase und der Serin/Threonin-Kinase Pto getestet (Böhmer, 2005; Zhang et al., 2005). Für das Modellenzym NtCDPK2 konnte im Anschluss an die entsprechende Mutation im Rahmen der biochemischen Charakterisierung kein Verlust der Kinaseaktivität und Substratspezifität nachgewiesen werden (Böhmer, 2005). Die Generierung von chemisch hemmbaren Mutantenlinien erfolgte anschließend in *Arabidopsis thaliana* am Beispiel der NtCDPK2-Isoform AtCPK1. Die Zugabe von 100 μ M 1-Naphthyl-PP1 bewirkt nach Kältestress unter anderem eine 60%ige Reduktion der Expression des Kältemarkers CBF3 (Böhmer, 2005). Bei der Kinase Pto aus Tomate resultiert die Mutation der ATP-Bindetasche, welche die Sensibilisierung gegen 1-Naphthyl-PP1 ermöglicht, im Verlust der Kinaseaktivität, wie er bisher bei etwa 30% der derartig mutierten Kinasen beobachtet wurde (Zhang et al., 2005). Für einige dieser inaktivierten Kinasen konnte durch eine zweite Mutation in der N-terminalen Untereinheit der Kinasen die Kinaseaktivität ganz (z.B. GRK2) oder teilweise (z.B. Pto) wiederhergestellt werden. Angaben zu den Auswirkungen der zweifachen Mutagenese von Pto *in planta* sind nicht verfügbar. Diese Daten zeigen, dass bei der Umgehung der Embryoletalität der *mpk3/mpk6*-Doppelnulldmutante auch Strategien aus dem Bereich der chemischen Genetik zum Erfolg führen könnten.

In Bezug auf eine schnelle und möglichst umfassende Vervollständigung des Wissens über Signalnetzwerke in *Arabidopsis thaliana* wären auf genetischen Methoden basierende Hochdurchsatzanalysen wünschenswert. Diese genomweiten Analysen hätten zudem den Vorteil, dass sie im Vergleich zur gezielten Untersuchung von einzelnen Kandidatengen weniger voreingenommen sind (Friedman and Perrimon, 2006b). In verschiedenen tierischen Modellsystemen kamen in großangelegten Studien bisher genomweite *cDNA-Microarrays*

sowie genomweite RNAi-Studien zum Einsatz (Asha et al., 2003; Jordan et al., 2005; Friedman and Perrimon, 2006a, b).

Durch den Vergleich der Genexpression von Wildtyp- und *knock out*-Linien unter Einwirkung verschiedener Stressoren mittels *Microarrays* lassen sich Gene auffindig machen, die als Ziele der entsprechenden Signalwege dem jeweils untersuchten Gen nachgeschaltet sind. Eine Identifizierung von vorgelagerten Regulatoren ist mit Hilfe von *cDNA-Microarrays* jedoch nicht möglich. Im Allgemeinen lässt sich die auf *Microarrays* basierende Form der Hochdurchsatzanalyse ohne weiteres auch in Pflanzen durchführen.

In *Drosophila melanogaster* erfolgte die Identifizierung von Regulatoren der Signalgebung, welche durch verschiedene Rezeptortyrosinkinasen und die MAPK ERK vermittelt wird, mit Hilfe einer genomweiten RNAi-Studie (Friedman and Perrimon, 2006a). Dazu wurden Aliquots einer *Drosophila*-Zellkultur in 384er Mikrotiterplatten direkt mit doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA) inkubiert, wodurch in den Zellen RNAi-Effekte induziert wurden. Ausgewertet wurde diese primäre Untersuchung anhand der Veränderungen im Phosphorylierungsgrad der MAPK ERK. Durch den Einsatz einer Sammlung von mehr als 20.000 dsRNAs konnten so mehr als 1.100 interessante Kandidatengene identifiziert werden. Im Anschluss daran erfolgte eine Klassifizierung der Kandidaten anhand der Untersuchung von Aktivierungsmustern in verschiedenen Zellkulturen, nach der Stimulierung verschiedener Rezeptorkinasen sowie mittels erster Experimente zur Validierung der ersten putativen Regulatoren (Friedman and Perrimon, 2006a). In *Arabidopsis thaliana* sind Studien von diesem Umfang, welche durch die Inkubation von Zellkulturen mit nackten, den RNAi-Effekt induzierenden RNA-Molekülen erst machbar werden, nicht möglich.

4.4 Perspektiven für die Isolierung von AtMPK3-haltigen Proteinkomplexen

Die Etablierung und Optimierung der Tandemaffinitätsreinigung von AtMPK3 hat sich als schwierig erwiesen. Trotzdem konnte in der vorliegenden Arbeit in dem komplex zusammengesetzten Eluat aus der zweistufigen Affinitätsreinigung durch MALDI-TOF MS-Analyse ein niedrig abundantes Protein wie AtMPK3 aus Blattmaterial identifiziert werden. Allerdings gelang in den selben Proben kein Nachweis von putativen AtMPK3-Interaktoren. Prinzipiell stehen für die Analyse des Proteoms mittlerweile jedoch auch Techniken zur Verfügung, welche die Identifizierung und Quantifizierung von immer komplexeren Proteingemischen ermöglichen. Es bleibt daher zu klären, ob mit anderen Techniken der Proteomik wie ein- oder mehrdimensionaler LC gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie putative AtMPK3-Interaktoren nachweisbar sind. Erleichtert werden würde die Isolierung von AtMPK3-haltigen

Proteinkomplexen zudem durch die Verfügbarkeit von Pflanzenmaterial, in dem ein größerer Anteil an AtMPK3 in Proteinkomplexen nachweisbar ist als es in Blattmaterial der Fall war und in dem auch Epitop-markierte AtMPK3 exprimiert werden kann. Angesichts der Limitationen anderer experimenteller Ansätze zur funktionellen Analyse von MAPKs wie AtMPK3 kann für die Erstellung von möglichst vollständigen Interaktionsnetzwerken nicht vollständig auf Daten verzichtet werden, welche auf der direkten Untersuchung des Proteoms beruhen.

5 Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B.** (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 601-611.
- Adachi, J., Kumar, C., Zhang, Y., Olsen, J.V., and Mann, M.** (2006). The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* **7**, R80.
- Ahlfors, R., Macioszek, V., Rudd, J., Brosche, M., Schlichting, R., Scheel, D., and Kangasjarvi, J.** (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J* **40**, 512-522.
- Ando, R., Mizuno, H., and Miyawaki, A.** (2004). Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science* **306**, 1370-1373.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., and Mundy, J.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *Embo J* **24**, 2579-2589.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C.R.** (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* **163**, 203-215.
- Bardwell, L., and Shah, K.** (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods* **40**, 213-223.
- Basmaji, F., Martin-Yken, H., Durand, F., Dagkessamanskaia, A., Pichereaux, C., Rossignol, M., and Francois, J.** (2006). The 'interactome' of the Knr4/Smi1, a protein implicated in coordinating cell wall synthesis with bud emergence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **275**, 217-230.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J., Slijper, M., and Menke, F.L.** (2007). Quantitative phospho-proteomics of early elicitor signalling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*.
- Benzinger, A., Muster, N., Koch, H.B., Yates, J.R., 3rd, and Hermeking, H.** (2005). Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics* **4**, 785-795.
- Bergmann, D.C., Lukowitz, W., and Somerville, C.R.** (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**, 1494-1497.

- Bethke, G.** (2004). Analyse der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Komponenten aus Arabidopsis MAP-Kinase-Kaskaden mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), pp. 79.
- Bhat, R.A., Lahaye, T., and Panstruga, R.** (2006). The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**, 12.
- Bhattacharyya, R.P., Remenyi, A., Yeh, B.J., and Lim, W.A.** (2006a). Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem* **75**, 655-680.
- Bhattacharyya, R.P., Remenyi, A., Good, M.C., Bashor, C.J., Falick, A.M., and Lim, W.A.** (2006b). The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science* **311**, 822-826.
- Bishop, A.C., Buzko, O., and Shokat, K.M.** (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol* **11**, 167-172.
- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O., and Shokat, K.M.** (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401.
- Blagoev, B., and Mann, M.** (2006). Quantitative proteomics to study mitogen-activated protein kinases. *Methods* **40**, 243-250.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Böhmer, M.** (2005). Funktionelle Charakterisierung von AtCPK1 und AtCPK2 aus Arabidopsis thaliana unter Verwendung einer chemisch-genetischen Methode (Philipps-Universität Marburg), pp. 127.
- Bogoyevitch, M.A., and Kobe, B.** (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1061-1095.
- Burack, W.R., and Shaw, A.S.** (2005). Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J Biol Chem* **280**, 3832-3837.
- Burckstummer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A.** (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* **3**, 1013-1019.
- Camacho-Carvajal, M.M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V., and Schamel, W.W.** (2004). Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* **3**, 176-182.
- Carroll, A.S., Bishop, A.C., DeRisi, J.L., Shokat, K.M., and O'Shea, E.K.** (2001). Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12578-12583.

- Chang, I.F.** (2006). Mass spectrometry-based proteomic analysis of the epitope-tag affinity purified protein complexes in eukaryotes. *Proteomics* **6**, 6158-6166.
- Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., and Cho, M.J.** (2003). BWMK1, a Rice Mitogen-Activated Protein Kinase, Locates in the Nucleus and Mediates Pathogenesis-Related Gene Expression by Activation of a Transcription Factor. *Plant Physiol* **132**, 1961-1972.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-10890.
- Dard, N., and Peter, M.** (2006). Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays* **28**, 146-156.
- DeFea, K.A., Vaughn, Z.D., O'Bryan, E.M., Nishijima, D., Dery, O., and Bunnett, N.W.** (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11086-11091.
- Droillard, M.J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C.** (2004). Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Lett* **574**, 42-48.
- Elion, E.A.** (2001). The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**, 3967-3978.
- Elion, E.A.** (2006). Methods for analyzing MAPK cascades. *Methods* **40**, 207-208.
- Eubel, H., Braun, H.P., and Millar, A.H.** (2005). Blue-Native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* **1**, 11.
- Farooq, A., and Zhou, M.M.** (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* **16**, 769-779.
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., Meyer, S., Immink, R.G., Koenig, A., Possling, A., Seitz, H., Beveridge, A., Scheel, D., Cahill, D.J., Lehrach, H., Kreutzberger, J., and Kersten, B.** (2005). High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1558-1568.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**, 265-276.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W.** (2003). The COP9 Signalosome Interacts Physically with SCFCO11 and Modulates Jasmonate Responses. *The Plant Cell* **15**, 1083-1094.
- Flotho, A., Simpson, D.M., Qi, M., and Elion, E.A.** (2004). Localized feedback phosphorylation of Ste5p scaffold by associated MAPK cascade. *J Biol Chem* **279**, 47391-47401.

- Forreiter, C., Kirschner, M., and Nover, L.** (1997). Stable transformation of an Arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell* **9**, 2171-2181.
- Friedman, A., and Perrimon, N.** (2006a). A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signalling. *Nature* **444**, 230-234.
- Friedman, A., and Perrimon, N.** (2006b). High-throughput approaches to dissecting MAPK signaling pathways. *Methods* **40**, 262-271.
- Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R.E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M.** (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J Biol Chem* **281**, 8917-8926.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B., and Superti-Furga, G.** (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**, 631-636.
- Gijzen, M., and Nurnberger, T.** (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**, 1800-1807.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**, 251-256.
- Graumann, J., Dunipace, L.A., Seol, J.H., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Wold, B.J., and Deshaies, R.J.** (2004). Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics* **3**, 226-237.
- Gruhler, A., Schulze, W.X., Matthiesen, R., Mann, M., and Jensen, O.N.** (2005). Stable isotope labeling of Arabidopsis thaliana cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1697-1709.

- Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P., and Huang, L.** (2006). An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. *Mol Cell Proteomics* **5**, 366-378.
- Guo, H.S., Fei, J.F., Xie, Q., and Chua, N.H.** (2003). A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant J* **34**, 383-392.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., and Davis, R.J.** (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**, 2760-2770.
- Hadiarto, T., Nanmori, T., Matsuoka, D., Iwasaki, T., Sato, K., Fukami, Y., Azuma, T., and Yasuda, T.** (2006). Activation of Arabidopsis MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta* **223**, 708-713.
- Harris, K., Lamson, R.E., Nelson, B., Hughes, T.R., Marton, M.J., Roberts, C.J., Boone, C., and Pryciak, P.M.** (2001). Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins. *Curr Biol* **11**, 1815-1824.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figgeys, D., and Tyers, M.** (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-183.
- Horiguchi, G.** (2004). RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. *Differentiation* **72**, 65-73.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., and Shinozaki, K.** (1998). Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 532-543.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., and Shirasu, K.** (2006). MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**, 36969-36976.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y.** (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-4574.
- Jin, H., Liu, Y., Yang, K.Y., Kim, C.Y., Baker, B., and Zhang, S.** (2003). Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J* **33**, 719-731.

- Jin, J., Smith, F.D., Stark, C., Wells, C.D., Fawcett, J.P., Kulkarni, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Taylor, P., Taylor, L., Zougman, A., Woodgett, J.R., Langeberg, L.K., Scott, J.D., and Pawson, T.** (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* **14**, 1436-1450.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jordan, K.C., Hatfield, S.D., Tworoger, M., Ward, E.J., Fischer, K.A., Bowers, S., and Ruohola-Baker, H.** (2005). Genome wide analysis of transcript levels after perturbation of the EGFR pathway in the Drosophila ovary. *Dev Dyn* **232**, 709-724.
- Joshi, S., and Burrows, R.** (1990). ATP synthase complex from bovine heart mitochondria. Subunit arrangement as revealed by nearest neighbor analysis and susceptibility to trypsin. *J Biol Chem* **265**, 14518-14525.
- Junttila, M.R., Saarinen, S., Schmidt, T., Kast, J., and Westermarck, J.** (2005). Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics* **5**, 1199-1203.
- Kaneko, A., Umeyama, T., Hanaoka, N., Monk, B.C., Uehara, Y., and Niimi, M.** (2004). Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast* **21**, 1025-1033.
- Katou, S., Karita, E., Yamakawa, H., Seo, S., Mitsuhashi, I., Kuchitsu, K., and Ohashi, Y.** (2005). Catalytic activation of the plant MAPK phosphatase NtMKP1 by its physiological substrate salicylic acid-induced protein kinase but not by calmodulins. *J Biol Chem* **280**, 39569-39581.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., and Gribskov, M.** (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 908-925.
- Kim, C.G., and Sheffery, M.** (1990). Physical characterization of the purified CCAAT transcription factor, alpha-CP1. *J Biol Chem* **265**, 13362-13369.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E., Lowe, N., Wang, W., and Liu, X.** (2003). Identification of novel protein-protein interactions using a versatile Mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1225-1233.
- Koch, H.B., Zhang, R., Verdoodt, B., Bailey, A., Zhang, C.D., Yates, J.R., 3rd, Menssen, A., and Hermeking, H.** (2007). Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle* **6**, 205-217.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2940-2945.
- Kranz, J.E., Satterberg, B., and Elion, E.A.** (1994). The MAP kinase Fus3 associates with and phosphorylates the upstream signaling component Ste5. *Genes Dev* **8**, 313-327.
- Kumar, A., and Snyder, M.** (2002). Protein complexes take the bait. *Nature* **415**, 123-124.

- Kunkel, G.R., Mehrabian, M., and Martinson, H.G.** (1981). Contact-site cross-linking agents. *Mol Cell Biochem* **34**, 3-13.
- Li, S., Armstrong, C.M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.O., Han, J.D., Chesneau, A., Hao, T., Goldberg, D.S., Li, N., Martinez, M., Rual, J.F., Lamesch, P., Xu, L., Tewari, M., Wong, S.L., Zhang, L.V., Berriz, G.F., Jacotot, L., Vaglio, P., Reboul, J., Hirozane-Kishikawa, T., Li, Q., Gabel, H.W., Elewa, A., Baumgartner, B., Rose, D.J., Yu, H., Bosak, S., Sequerra, R., Fraser, A., Mango, S.E., Saxton, W.M., Strome, S., Van Den Heuvel, S., Piano, F., Vandenhaute, J., Sardet, C., Gerstein, M., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K.C., Harper, J.W., Cusick, M.E., Roth, F.P., Hill, D.E., and Vidal, M.** (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-543.
- Liu, X., and Bush, D.R.** (2006). Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino Acids* **30**, 113-120.
- Liu, Y., and Zhang, S.** (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3386-3399.
- Liu, Y., Jin, H., Yang, K.Y., Kim, C.Y., Baker, B., and Zhang, S.** (2003). Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling. *Plant J* **34**, 149-160.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D., and Romeis, T.** (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10736-10741.
- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., and Lefkowitz, R.J.** (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2449-2454.
- Madhani, H.D.** (2006). Functional analysis of protein kinase networks in living cells: beyond "knock-outs" and "knock-downs". *Methods* **40**, 251-254.
- Madhani, H.D., and Fink, G.R.** (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet* **14**, 151-155.
- MAPK-Group.** (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**, 301-308.
- Marenda, D.R., Vrailas, A.D., Rodrigues, A.B., Cook, S., Powers, M.A., Lorenzen, J.A., Perkins, L.A., and Moses, K.** (2006). MAP kinase subcellular localization controls both pattern and proliferation in the developing *Drosophila* wing. *Development* **133**, 43-51.
- Marles, J.A., Dahesh, S., Haynes, J., Andrews, B.J., and Davidson, A.R.** (2004). Protein-protein interaction affinity plays a crucial role in controlling the sho1p-mediated signal transduction pathway in yeast. *Mol Cell* **14**, 813-823.

- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., Basmaji, F., Lagorce, A., and Francois, J.** (2003). The interaction of Slr2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **49**, 23-35.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Menges, M., and Murray, J.A.** (2006). Synchronization, transformation, and cryopreservation of suspension-cultured cells. *Methods Mol Biol* **323**, 45-61.
- Menke, F.L., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M., and Klessig, D.F.** (2004). Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Menke, F.L., Kang, H.G., Chen, Z., Park, J.M., Kumar, D., and Klessig, D.F.** (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1027-1034.
- Meszáros, T., Helfer, A., Hatzimasoura, E., Magyar, Z., Serazetdinova, L., Rios, G., Bardocz, V., Teige, M., Koncz, C., Peck, S., and Bogre, L.** (2006). The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J* **48**, 485-498.
- Miki, D., Itoh, R., and Shimamoto, K.** (2005). RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* **138**, 1903-1913.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Zhang, Y., and Ellis, B.E.** (2005). RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environ Pollut* **138**, 230-237.
- Miller, I., Crawford, J., and Gianazza, E.** (2006). Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* **6**, 5385-5408.
- Mishra, N.S., Tuteja, R., and Tuteja, N.** (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* **452**, 55-68.
- Morrison, D.K., and Davis, R.J.** (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 91-118.
- Nakagami, H., Kiegerl, S., and Hirt, H.** (2004). OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem*.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H.** (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* **10**, 339-346.
- Nakagami, H., Soukupova, H., Schikora, A., Zarsky, V., and Hirt, H.** (2006). A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **281**, 38697-38704.
- Nuhse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., and Boller, T.** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem* **275**, 7521-7526.

- Orlando, V.** (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* **25**, 99-104.
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., and Hirt, H.** (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *Embo J* **22**, 1282-1288.
- Park, S.H., Zarrinpar, A., and Lim, W.A.** (2003). Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* **299**, 1061-1064.
- Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A., and Dougherty, W.G.** (1994). Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem* **216**, 413-417.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H.** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183.
- Peng, Z., Serino, G., and Deng, X.-W.** (2001). A role of Arabidopsis COP9 Signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* **128**, 4277-4288.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy, J.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A.G., Tropea, J.E., Peters, H.K., 3rd, Kapust, R.B., Li, M., Wlodawer, A., and Waugh, D.S.** (2002). Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *J Biol Chem* **277**, 50564-50572.
- Piehler, J.** (2005). New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 4-14.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- Qutob, D., Kamoun, S., and Gijzen, M.** (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant J* **32**, 361-373.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Lubracki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M., and Nurnberger, T.** (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**, 3721-3744.
- Rabilloud, T.** (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., and Barrett, A.J.** (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **34**, D270-272.

- Remenyi, A., Good, M.C., and Lim, W.A.** (2006). Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 676-685.
- Remenyi, A., Good, M.C., Bhattacharyya, R.P., and Lim, W.A.** (2005). The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**, 951-962.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**, 537-542.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R., and Fromm, M.E.** (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* **38**, 172-181.
- Rohila, J.S., Chen, M., Chen, S., Chen, J., Cerny, R., Dardick, C., Canlas, P., Xu, X., Gribskov, M., Kanrar, S., Zhu, J.K., Ronald, P., and Fromm, M.E.** (2006). Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant J* **46**, 1-13.
- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmaroli, G., Dinesh-Kumar, S.P., and Deng, X.W.** (2005). An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *Plant J* **41**, 767-778.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press).
- Sanchez, C., Sanchez, I., Demmers, J.A., Rodriguez, P., Strouboulis, J., and Vidal, M.** (2007). Proteomic analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbx110/ Jmjd1B histone demethylase and the BcoR corepressor. *Mol Cell Proteomics*.
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., and Machida, Y.** (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev* **20**, 1004-1014.
- Schaller, A.** (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183-197.

- Schmitt-Ulms, G., Hansen, K., Liu, J., Cowdrey, C., Yang, J., DeArmond, S.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., and Baldwin, M.A.** (2004). Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. *Nat Biotechnol* **22**, 724-731.
- S raphin, B., Puig, O., Bouveret, E., Rutz, B., and Caspary, F.** (2002). Tandem Affinity Purification to Enhance Interacting Protein Identification. In *Protein-Protein-Interactions: A Molecular Cloning Manual*, E. Golemis, ed (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 313 - 328.
- Spielau, C.** (2004). Grundlagen der Analyse von Proteinkinase-Komplexen mittels Tandem Affinity Purification (TAP) aus transgenen *Arabidopsis thaliana* (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), pp. 63.
- Spring, D.R.** (2005). Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights. *Chem Soc Rev* **34**, 472-482.
- Sriyam, S., Sinchaikul, S., Tantipaiboonwong, P., Tzao, C., Phutrakul, S., and Chen, S.T.** (2006). Enhanced detectability in proteome studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*.
- Stafstrom, J.P., Altschuler, M., and Anderson, D.H.** (1993). Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Mol Biol* **22**, 83-90.
- Staiger, D., Kaulen, H., and Schell, J.** (1989). A CACGTG motif of the *Antirrhinum majus* chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionarily conserved nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6930-6934.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., and Krysan, P.J.** (2007). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* **143**, 661-669.
- Suchanek, M., Radzikowska, A., and Thiele, C.** (2005). Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**, 261-267.
- Tanoue, T., and Nishida, E.** (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**, 455-462.
- Tarrega, C., Rios, P., Cejudo-Marin, R., Blanco-Aparicio, C., van den Berk, L., Schepens, J., Hendriks, W., Tabernero, L., and Pulido, R.** (2005). ERK2 shows a restrictive and locally selective mechanism of recognition by its tyrosine phosphatase inactivators not shared by its activator MEK1. *J Biol Chem* **280**, 37885-37894.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., and Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol Cell* **15**, 141-152.
- Terpe, K.** (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 523-533.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J.M.** (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- Uhrig, J.F.** (2006). Protein interaction networks in plants. *Planta* **224**, 771-781.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., and Paszkowski, J.** (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *Embo J* **21**, 6483-6493.
- Vasilescu, J., Guo, X., and Kast, J.** (2004). Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3845-3854.
- Wang, D., Harper, J.F., and Gribkov, M.** (2003). Systematic trans-genomic comparison of protein kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* **132**, 2152-2165.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., and Zhang, S.** (2007). Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Waas, W.F., and Dalby, K.N.** (2002). Transient protein-protein interactions and a random-ordered kinetic mechanism for the phosphorylation of a transcription factor by extracellular-regulated protein kinase 2. *J Biol Chem* **277**, 12532-12540.
- Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P., and Helliwell, C.** (2005). A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnol J* **3**, 583-590.
- Willoughby, E.A., Perkins, G.R., Collins, M.K., and Whitmarsh, A.J.** (2003). The JNK-interacting protein-1 scaffold protein targets MAPK phosphatase-7 to dephosphorylate JNK. *J Biol Chem* **278**, 10731-10736.
- Witte, C.P., Noel, L.D., Gielbert, J., Parker, J.E., and Romeis, T.** (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol* **55**, 135-147.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-4579.
- Yoshimura, S.H., Kim, J., and Takeyasu, K.** (2003). On-substrate lysis treatment combined with scanning probe microscopy revealed chromosome structures in eukaryotes and prokaryotes. *J Electron Microscop* (Tokyo) **52**, 415-423.
- Yukawa, Y., Fan, H., Akama, K., Beier, H., Gross, H.J., and Sugiura, M.** (2001). A tobacco nuclear extract supporting transcription, processing, splicing and modification of plant intron-containing tRNA precursors. *Plant J* **28**, 583-594.
- Zanetti, M.E., Chang, I.F., Gong, F., Galbraith, D.W., and Bailey-Serres, J.** (2005). Immunopurification of polyribosomal complexes of *Arabidopsis* for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* **138**, 624-635.

- Zhang, C., Kenski, D.M., Paulson, J.L., Bonshtien, A., Sessa, G., Cross, J.V., Templeton, D.J., and Shokat, K.M.** (2005). A second-site suppressor strategy for chemical genetic analysis of diverse protein kinases. *Nat Methods* **2**, 435-441.
- Zenk, M.H.** (1982). Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung. *Naturwissenschaften* **69**, 534-536.
- Zheng, C., Lin, Z., Zhao, Z.J., Yang, Y., Niu, H., and Shen, X.** (2006). MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27. *J Biol Chem* **281**, 37215-37226.
- Zhu, H., and Snyder, M.** (2002). "Omic" approaches for unraveling signaling networks. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 173-179.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**, 764-767.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dierk Scheel für die Möglichkeit der Arbeit an diesem sehr interessanten Thema und für die hilfreichen Hinweise während der Bearbeitung bedanken. Mein Dank gilt zudem Dr. Justin Lee für die Diskussionen und die Vermittlung von Kenntnissen methodischer Art.

Mein Interesse an den Techniken der Proteomik und den damit verknüpften biologischen Fragestellungen wurde auch durch die vielseitigen aber auch tiefgründigen Diskussionen mit Dr. Kai Naumann bestärkt. Für die erhaltene Unterstützung bedanke ich mich weiterhin bei der gesamten Arbeitsgruppe. Abwechslungsreich, spannend und angenehm gestaltete sich die Zeit der Laborarbeit zudem durch die nette Gesellschaft meiner U-Mitbewohner Franziska, Steffi, Nora und Fritz. Das kritische Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und die daraus resultierenden konstruktiven Ratschläge verdanke ich Franziska, Kai und Mandy.

Des Weiteren half mir das Vertrauen und die moralische Unterstützung durch meine „bessere Hälfte“ Frank über wissenschaftliche Durststrecken hinweg. Überdies danke ich Frank und unserer Tochter Ella für die Erduldung meiner zum Ende der Arbeit teilweise recht ausgedehnten Arbeitszeiten. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle neben Frank auch meine Eltern, meine Schwiegereltern und meine Schwester. Ohne sie wäre es nicht möglich gewesen, meine Promotion trotz der gesundheitlichen Probleme meiner Tochter Ella in der angegebenen Zeit abzuschließen.

Dankeschön.

Publikationen und Vorträge

Ahlfors, R., Macioszek, V., Rudd, J., Brosche, M., Schlichting, R., Scheel, D., and Kangasjarvi, J. (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J* **40**, 512-522.

Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Luberacki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M., and Nurnberger, T. (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**, 3721-3744.

Schlichting, R., Vortrag „Funktionelle Analyse von MAP-Kinase Kaskaden in *Arabidopsis thaliana*.“ 19. Tagung “Molekularbiologie der Pflanzen”, Dabringhausen, 7.-10. März 2006

Lebenslauf

Geburtsdatum 10.08.1976
Nationalität Deutsche
Familienstand verheiratet, ein Kind

Schulbildung und Studium

06/1995 **Gymnasium Brand-Erbisdorf**
Abschluss: Abitur, Note 1,6

10/1996 – 05/2002 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
- Studienfach: Biologie, Studienschwerpunkte Genetik, Pflanzenphysiologie, Biochemie und Mikrobiologie
- Abschluss: Diplom-Biologin, Note 1,2

03/1999 – 12/1999 **University of Otago** (Dunedin, New Zealand)
- Studienfach: Botanik, Studienschwerpunkt Pflanzenphysiologie
- Abschluss: „Postgraduate Diploma in Science“, entspricht Bachelor (Honours), Awarded with Distinction

07/2002 – 03/2007 **Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie** in Halle
- Promotion zum Thema „Isolierung von MAP-Kinase-Proteinkomplexen aus *Arabidopsis thaliana*“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Scheel
- von Januar bis September 2005 Elternzeit

Arbeitserfahrungen

08/1995 – 04/1996 **Tätigkeit als Au pair** in Haslemere (Surrey, UK)

05/1996 – 08/1996 **Praktikum an der TU Bergakademie Freiberg**, Institut für Mineralogie
Mitarbeit am Projekt „Schadstoffe in Auenböden Sachsens“

seit 04/2007 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Cenix BioScience GmbH** in Dresden

Halle, den 30.04.2007

Rita Schlichting

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich zum ersten Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle, den 10.05.2007

Rita Schlichting