

Isolierung pathogen-induzierter MAP Kinase-
Signalkomplexe 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 Claudia Spielau

geb. am 31. August 1980 in Dessau

Gutachter

1. Prof. Dr. D. Scheel
2. Prof. Dr. U. Johanningmeier
3. Prof. Dr. H.-P. Braun

Halle (Saale), 01.02.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Ein- und Drei-Buchstabencode für Aminosäuren.....	VII
1. Einleitung	1-1
1.1 Pflanze-Pathogen Interaktionen.....	1-1
1.2 MAPK-Netzwerke in Pflanzen	1-4
1.3 Spezifität und Regulationsmechanismen von MAPK-Netzwerken	1-7
1.3.1 Proteinkomplexe und Gerüstproteine als Strukturelemente.....	1-8
1.4 Möglichkeiten der Proteom-Analyse zur Identifizierung von Signal-Netzwerken... 1-10	
1.4.1 Affinitäts-Reinigung von Proteinkomplexen.....	1-11
1.4.2 Identifizierung und Validierung von Signal-Komplexen.....	1-13
1.5 Zielsetzung	1-15
2. Material und Methoden.....	2-16
2.1 Material.....	2-16
2.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	2-16
2.2 Kulturbedingungen von Bakterien	2-16
2.2.1 Anzucht von Bakterien	2-16
2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	2-17
2.2.3 Transformation von Bakterien.....	2-17
2.3 Kulturbedingungen von Arabidopsis thaliana	2-17
2.3.1 Anzucht der Pflanzen.....	2-17
2.3.2 Anzucht der Zellsuspensionskultur.....	2-18
2.3.3 Pflanzen-Transformation und Selektion	2-18
2.3.4 Transformation von Zellsuspensionskulturen und Selektion.....	2-19
2.3.5 Protoplastenpräparation und Transfektion.....	2-19
2.3.6 Kreuzen	2-20
2.3.7 Elizitorbehandlung mit dem flg22-Peptid.....	2-20
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	2-21
2.4.1 Plasmide.....	2-21
2.4.2 Klonierung mit dem Gateway System	2-21
2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	2-21
2.4.4 Isolation genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe	2-22
2.4.5 DNA-Präzipitation	2-22
2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	2-22
2.4.7 Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen	2-23
2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	2-23
2.4.9 DNA-Geextraktion.....	2-24
2.4.10 Southern-Analyse (Southern 1975).....	2-24
2.4.11 Herstellung radioaktiv markierter Sonden.....	2-24
2.4.12 Hybridisierung.....	2-24
2.4.13 Isolation DNA-freier RNA aus pflanzlichem Gewebe.....	2-25
2.4.14 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	2-25
2.5 Proteinbiochemische Methoden	2-25
2.5.1 Proteinpräparation aus Bakterien	2-25
2.5.2 Proteinpräparation aus Pflanzen.....	2-26
2.5.3 Proteinbestimmung	2-26
2.5.4 Denaturierende und native Proteinpräzipitation sowie Entsalzung	2-26

2.5.5	Chemische Vernetzung von Proteinen (crosslinker).....	2-27
2.5.6	Ausschlusschromatographie.....	2-27
2.5.7	Aufreinigung eines Proteins mit einem His-Epitoptag.....	2-28
2.5.8	Aufreinigung eines Proteins mit einem Tandem Affinity Purification Tag (Puig et al. 2001) 2-28	
2.5.9	Aufreinigung eines Proteins mit einem strep Epitop-Tag (Witte et al. 2004).....	2-29
2.5.10	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	2-29
2.5.11	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE).....	2-30
2.5.12	Immuno-Detektion.....	2-30
2.5.13	Visualisierung von Proteinen in PA-Gelen.....	2-31
2.5.14	Entfärben von Proteinen in Gelmatrizen und tryptischer Verdau.....	2-31
2.5.15	Flüssig-Chromatographie Elektrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie (1D-nano-LC-ESI-IT-MS/MS).....	2-32
2.5.16	Datenbanksuche und Auswertung.....	2-32
2.6	BiFC und Mikroskopie.....	2-33
2.6.1	Statistische Auswertung.....	2-33
3.	Ergebnisse.....	3-35
3.1	Herstellung und Charakterisierung stabiler Transformanten.....	3-35
3.1.1	Charakterisierung von Zellsuspensionskulturen.....	3-35
3.1.2	Charakterisierung von Pflanzen-Transformanten.....	3-38
3.2	Chromatographische Anreicherung von Proteinkomplexen.....	3-48
3.2.1	Möglichkeiten zur Extraktion und Stabilisierung von Proteinkomplexen.....	3-48
3.2.2	Tandem-Affinitätschromatographie.....	3-54
3.2.3	StrepII-Affinitätschromatographie.....	3-56
3.3	Identifizierung ko-gereinigter Proteine.....	3-57
3.3.1	Protein-Identifizierungen nach Tandem-Affinitätschromatographie.....	3-59
3.3.2	Protein-Identifizierungen nach Strep-Affinitätschromatographie.....	3-64
3.3.3	Protein-Identifizierungen nach Affinitätschromatographie flg22-elizierter Pflanzen.....	3-68
3.3.4	Vergleich der Protein-Identifizierungen.....	3-72
3.4	Erste Analysen ko-gereinigter Proteine als putative MAPK-Interaktoren.....	3-73
4.	Diskussion.....	4-77
4.1	Isolierung von Proteinkomplexen aus Arabidopsis thaliana durch Affinitäts-Chromatographie.....	4-77
4.1.1	Funktionalität der MPK3-/MPK6-TAP und MPK6-strepII Proteine.....	4-80
4.1.2	Affinitätschromatographie von MAPK mittels TAP und strepII-Tag.....	4-81
4.2	Identifizierung von mit MPK3 und MPK6 ko-eluierten Proteinen.....	4-85
4.2.1	Vergleich der Identifizierungen aus der Tandem- und StrepII-Affinitätschromatographie 4-87	
4.2.2	Validierung putativer Interaktoren.....	4-92
4.2.3	Möglichkeiten zur Identifizierung weiterer MAPK Interaktoren aus Arabidopsis thaliana 4-93	
4.3	Zusammenfassung.....	4-96
4.4	Abstract.....	4-97
	Literaturverzeichnis.....	i
	Anhang	

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1 EVOLUTION DES PFLANZLICHEN PATHOSYSTEMS (ZICKZACK-MODELL, ENTWORFEN NACH JONES UND DANGL 2006)	1-3
ABBILDUNG 1-2 MODELL DER DURCH FLAGELLIN INDUZIERTEN SIGNALE UND MAPK KASKADEN.....	1-5
ABBILDUNG 1-3 STREPII-STRATEGIE (WITTE <i>ET AL.</i> 2004)	1-12
ABBILDUNG 1-4 TAP-STRATEGIE (RIGAUT <i>ET AL.</i> 1999)	1-13
ABBILDUNG 3-1 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLSUSPENSIONSKULTUREN (1).....	3-36
ABBILDUNG 3-2 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLSUSPENSIONSKULTUREN (2).....	3-37
ABBILDUNG 3-3 TANDEMAFFINITÄTS-PROTEINREINIGUNG VON MPK3-TAP EXPRIMIERENDEN ZELLSUSPENSIONSKULTUREN.....	3-38
ABBILDUNG 3-4 SELEKTION DER MPK4:MPK4-TAP TRANSFORMANTEN	3-40
ABBILDUNG 3-5 CHARAKTERISIERUNG DER MPK4:MPK4-TAP TRANSFORMANTEN	3-41
ABBILDUNG 3-6 FLG22-INDUZIERTE PHOSPHORYLIERUNG DER MAPK-TAP PROTEINE	3-42
ABBILDUNG 3-7 HINWEISE AUF DIE INTEGRATION VON TAP-MARKIERTEN MAPK IN PROTEINKOMPLEXE	3-43
ABBILDUNG 3-8 BIFC-ANALYSE DER MAPK-TAP PROTEINE (MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN)	3-44
ABBILDUNG 3-9 BIFC-ANALYSE DER MAPK-TAP PROTEINE (DIAGRAMM).....	3-45
ABBILDUNG 3-10 CHARAKTERISIERUNG DER 35S::MPK6-STREPII TRANSFORMANTEN	3-46
ABBILDUNG 3-11 FLG22-INDUZIERTE PHOSPHORYLIERUNG DER MPK6-STREPII PROTEINE.. 3- 47	
ABBILDUNG 3-12 HINWEISE AUF DIE INTEGRATION VON MPK6-STREPII IN PROTEINKOMPLEXE	3-48
ABBILDUNG 3-13 HINWEISE AUF DIE INTEGRATION VON ANGEREICHERTEN MAPK-TAP PROTEINEN IN KOMPLEXE	3-49
ABBILDUNG 3-14 VORFRAKTIONIERUNG VON PROTEINEXTRAKTEN.....	3-50
ABBILDUNG 3-15 RE-CHROMATOGRAPHIE VORFRAKTIONIERTER PROTEINKOMPLEXE.....	3-51
ABBILDUNG 3-16 CHEMISCHE QUERVERNETZUNG VON MAPK-TAP PROTEINEN	3-53
ABBILDUNG 3-17 HINWEISE AUF DIE STABILISIERUNG VON MPK3-TAP PROTEINKOMPLEXEN MITTELS CHEMISCHER VERNETZUNG	3-54
ABBILDUNG 3-18 TANDEM-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE DER MAPK-TAP PROTEINE... 3-55	
ABBILDUNG 3-19 EINFLUSS DER VORFRAKTIONIERUNG AUF DIE TANDEMAFFINITÄTS- CHROMATOGRAPHIE	3-56
ABBILDUNG 3-20 AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE DER MPK6-STREPII	3-57
ABBILDUNG 3-21 SCHEMA DER MASSENSPEKTROMETRISCHEN ANALYSE	3-58
ABBILDUNG 3-22 VERGLEICH DER ELUATE AUS MPK3-TAP, MPK6-TAP UND EV TAP TANDEM- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	3-59
ABBILDUNG 3-23 AUSWERTUNG DER TANDEM-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	3-61
ABBILDUNG 3-24 VERTEILUNG DER PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER TANDEM- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	3-64
ABBILDUNG 3-25 PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER STREPII- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	3-65
ABBILDUNG 3-26 TANDEM-AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE MIT FLG22-ELIZITIERTEN MPK- TAP PFLANZEN	3-68
ABBILDUNG 3-27 PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER TANDEM- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON FLG22-ELIZITIERTEN PFLANZEN	3-69
ABBILDUNG 3-28 PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS STREPII- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON FLG22-ELIZITIERTEN PFLANZEN	3-70
ABBILDUNG 3-29 VERTEILUNG DER PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER STREP- AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	3-70
ABBILDUNG 3-30 VERGLEICH DER PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS LC-MS/MS MESSUNGEN.....	3-73
ABBILDUNG 3-31 BIFC-ANALYSE DER PUTATIVEN INTERAKTOREN (DIAGRAMM)	3-75
ABBILDUNG 4-1 ÜBERSICHT DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN STRATEGIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MAPK PROTEINKOMPLEXEN	4-79
ABBILDUNG A-1 BIFC-ANALYSE DER PUTATIVEN INTERAKTOREN	
ABBILDUNG A-2 VERGLEICHENDE ANALYSE DER BIOLOGISCHEN GO KATEGORIEN (TAP)	
ABBILDUNG A-3 VERGLEICHENDE ANALYSE DER BIOLOGISCHEN GO KATEGORIEN (STREP)	

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1 VERSCHIEDENE FUNKTIONEN DER MAPK MPK3, MPK4 UND MPK6 IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	1-4
TABELLE 2-1 BAKTERIENSTÄMME	2-16
TABELLE 2-2 STABILE TRANSGENE PFLANZENLINIEN UND ZELLSUSPENSIONSKULTUREN ..2-18	
TABELLE 2-3 PLASMIDE.....	2-21
TABELLE 2-4 PCR KOMPONENTEN	2-22
TABELLE 2-5 BEDINGUNGEN FÜR PRIMÄRE ANTIKÖRPER	2-30
TABELLE 2-6 PARAMETER FÜR DIE MASCOT DATENBANKSUCHE	2-32
TABELLE 3-1 TRANSGENE MAPK-TAP EXPRIMIERENDE PFLANZENLINIEN.....	3-38
TABELLE 3-2 AUSGEWÄHLTE QUERVERNETZER	3-52
TABELLE 3-3 PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER TANDEM-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT UND OHNE AMMONIUMSULFAT-VORFRAKTIONIERUNG	3-63
TABELLE 3-4 PROTEIN-IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER STREPII-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	3-67
TABELLE 3-5 IDENTIFIZIERTE PROTEINE AUS DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON FLG22-ELIZITIERTEN TAP-PFLANZEN.....	3-69
TABELLE 3-6 IDENTIFIZIERTE PROTEINE AUS DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON FLG22-ELIZITIERTEN STREPII-PFLANZEN	3-71
TABELLE 4-1 VERGLEICH DER PUTATIVEN MPK3- BZW. MPK6 INTERAKTOREN AUS DER TAP-UND STREP-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, PROTEIN-ARRAY-STUDIEN (FEILNER <i>ET AL.</i> 2005, POPESCU <i>ET AL.</i> 2009) UND EINER HEFE-2-HYBRID ANALYSE (J. UHRIG, UNVERÖFFENTLICHT)	4-91
TABELLE A-1 ANOVA ANALYSE	
TABELLE A-2 OLIGONUKLEOTIDE	
TABELLE A-3 IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER TANDEM-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	
TABELLE A-4 IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER STREPII-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (1)	
TABELLE A-5 IDENTIFIZIERUNGEN AUS DER STREPII-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (2)	

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Ammoniumsulfat
At, <i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ackerschmalwand
ATP	Adenosintriphosphat
Avr-	Avirulenz-
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CBP	Calmodulin Bindepeptid
CC	<i>Coiled-coil</i>
cDNA	copy (<i>complementary</i>) DNA
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
Col-0	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Columbia
2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DEPC	Diethyl-pyrocbonat; C ₆ H ₁₀ O ₅
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> , und andere
FA	Ameisensäure
Flg22	Flagellin-Peptid (22 Aminosäuren)
Flg-TAP-Eluat	Eluat aus TAP mit flg22-elizitiertem Proteinmaterial
FLS2	Flaggelin sensitiv 2 (Rezeptorkinase)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FT ICR	Fourier-Transformations Ionen-Cyclotron-Resonanz
fwd	<i>forward</i> ; vorwärts
g	Einheit der Fallbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GeLC	1D-Gel/LC-MS/MS
HR	Hypersensitive Reaktion
IgG	Immunglobulin G

VI

IT	Ionenfalle (<i>ion trap</i>)
JA	Jasmonsäure
kDa	Kilo-Dalton
K.O.	<i>Knock Out</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Flüssig-Chromatographie
Ler-0	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Landsberg <i>erecta</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin rich repeat</i> ; Leucin-reiche Sequenzwiederholung
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation
MAPK / MPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i> ; allgemeines Substrat von MAPK
MG	Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NB	<i>Nucleotide-binding</i>
NP-40	Nonidet P-40
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>p.A.</i>	<i>pro Analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekülmuster
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR-	<i>Pathogenesis related</i> ; mit der Pathogenese zusammenhängend
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R-	Resistenz-
RBCL	Große Untereinheit der RuBisCO
rev	<i>reverse</i> ; rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SA	Sequenzabdeckung
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep	StrepII-Tag (Sequenz WSHPQFEK)
TAP	<i>Tandem-Affinity-Purification</i>
TBST	<i>Tris buffered saline-Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure

T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TEV Protease	<i>Tobacco etch virus</i> Protease
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	<i>toll like receptor</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TTSS	Typ III Sekretion-System
U min ⁻¹	Umdrehung pro Minute
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
Vgl.	Vergleiche
VF	Vorfraktionierung
VF-TAP-Eluat	Eluat aus TAP mit vorfraktionierten Proteinextrakten
Vol.	Volumen
% (v v ⁻¹)	<i>volume per volume</i> ; Volumenprozent
WT	Wildtyp
% (w v ⁻¹)	<i>weight per volume</i> ; Gewichtsprozent
YFP	<i>yellow fuorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
B	Asx	Asparagin oder Aspartat	P	Pro	Prolin
C	Cys	Cystein	Q	Gln	Glutamin
D	Asp	Aspartat	R	Arg	Arginin
E	Glu	Glutamat	S	Ser	Serin
F	Phe	Phenylalanin	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	V	Val	Valin
H	His	Histidin	W	Trp	Tryptophan
I	Ile	Isoleucin	Y	Tyr	Tyrosin
K	Lys	Lysin	Z	Glx	Glutamin oder Glutamat
L	Leu	Leucin			
M	Met	Methionin	X		beliebige Aminosäure

1. Einleitung

Das Genom der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* wurde im Jahr 2000 vollständig entschlüsselt und war damit das erste sequenzierte Pflanzengenom (*Arabidopsis Genome Initiative* 2000). Die vollständige Sequenzierung ermöglichte eine umfassende Annotierung von u.a. Genen und Transposons. So enthält das *Arabidopsis thaliana* Genom 1.323 Gensequenzen, denen eine putative Kinase-Aktivität zugeordnet wird, und 1.016 Gene mit einer möglichen Beteiligung an Signaltransduktions-Prozessen (TAIR8, www.arabidopsis.org/servlets/MultiServlet 23.02.09). Die Zahl der daraus resultierenden Enzymaktivitäten kann weitaus größer sein, berücksichtigt man u.a. Spleißvarianten oder post-translationale Proteinmodifikationen (PTM) wie Methylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung. Letztere spielt bei der Regulation der Signaltransduktion eine wichtige Rolle, da sie verschiedene Proteineigenschaften wie die enzymatische Aktivität, die Umsatzrate (*Turnover*), die subzelluläre Lokalisation sowie Protein-Interaktionen beeinflussen kann.

Die Aktivität von Proteinkinasen wird ebenfalls meist über Phosphorylierungen reguliert. Sie spielen eine übergeordnete Rolle in der Signaltransduktion während verschiedener Entwicklungsprozesse oder der Stress-Perzeption. Kenntnisse über das Zusammenspiel von Proteinkinasen mit Phosphatasen und Substraten in Signaltransduktions-Netzwerken können wiederum das Verständnis für die ausgeprägte Adaption von Pflanzen an ihre Umweltbedingungen sowie die Perzeption abiotischer und biotischer Stress-Faktoren erhöhen.

1.1 Pflanze-Pathogen Interaktionen

Mikroorganismen können auf unterschiedliche Weise mit Pflanzen interagieren. Bei einer symbiotischen Beziehung, wie zum Beispiel bei Rhizobien und Leguminosen, ist die Interaktion zwischen Bakterien und Pflanzen von gegenseitigem Vorteil. Pathogene dagegen lösen Krankheiten bei den besiedelten Pflanzenarten aus. Sie sind verantwortlich für eine Reihe von ökologischen und ökonomischen Schäden bei der Landwirtschaft weltweit.

In einem der ersten Schritte einer Infektion stellen Pathogene den Kontakt zu ihrem Wirt an der Pflanzenoberfläche her oder gelangen über die Stomata in den Interzellularraum. Pflanzen schützen sich davor mit physikalischen und chemischen Barrieren, der prä-invasiven Immunität. Dazu gehören oberflächliche Abschlussgewebe (Rinde, Kutikula) und die Pathogen-induzierte Schließung der Stomata sowie die Produktion von antimikrobiellen Sekundärmetaboliten (Dangl und Jones 2001, Göhre und Robatzek 2008, Schopfer & Brennicke 1999). Der Apoplast erschwert mit den stabilen Zellwänden zusätzlich die Penetration durch

Pathogene. Das Zusammenspiel dieser Barrieren kann zu einer nicht-wirtsspezifischen Resistenz gegenüber Pathogenen, die für andere Wirte virulent sind, führen.

Um im Apoplasten überleben zu können haben einige Pathogene Strukturen entwickelt, die die pflanzlichen Barrieren umgehen. Zell-Attacken können zum Beispiel über das bakterielle Typ III Sekretion-System (TTSS) erzielt werden. Fungi sind teilweise in der Lage, über die Ausbildung von Haustorien Pflanzenzellen zu penetrieren. Damit können sich Pathogene mit Nährstoffen versorgen und die pflanzliche Immunantwort durch die Freisetzung von Effektoren suprimieren (Göhre und Robatzek 2008).

Um eine Besiedlung mit Pathogenen zu behindern haben Pflanzen neben den physikalischen und chemischen Barrieren weitere Abwehr-Strategien entwickelt. Diese beinhalten Erkennungs-Systeme, die nach einem Kontakt mit nicht-selbst Molekülen sehr schnell eine induzierbare Immunreaktion auslösen, die durch anhaltenden Pathogen-Kontakt verstärkt wird. Solche nicht-spezifischen pathogenassoziierten Molekülmuster (PAMPs, *pathogen associated molecular pattern*) sind meist hoch konservierte, oberflächenexponierte und für die Vitalität der Pathogene wichtige Faktoren, wie zum Beispiel die strukturbildenden Chitine, Lipopolysaccharide (LPS) oder das Flagellin (Nürnberger und Brunner 2002, Thomma *et al.* 2001, Jones und Dangl 2006).

Die rezeptorvermittelte Immunantwort führt über die Aktivierung von Calcium-Strömen und Signalkaskaden zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Expression anti-mikrobieller Produkte, zum Beispiel von PR- (*pathogenesis related*) Proteinen. Weiterhin kommt es zur Akkumulation von Metaboliten (z.B. Camalexin) und Lignin-Ablagerungen in der Zellwand (Dangl 1998, Ren *et al.* 2008, Schopfer und Brennicke 1999). Diese induzierbare Pathogen-Abwehr wird auch als PAMP-vermittelte Immunität (PTI, *PAMP triggered immunity*) bezeichnet (Abbildung 1-1).

Einige Pathogene haben daraufhin Effektoren entwickelt, die diese PAMP-vermittelte Immunität suprimieren können. Diese Effektoren, die auch als Avirulenz-Genprodukte bezeichnet werden, sind pathogenspezifisch und wurden wahrscheinlich als Überlebensstrategie in kompatiblen Wirten entwickelt. Ihre Wirkungsweise kann die Invasion des Wirts unterstützen, die wirtsspezifische Immunantwort unterdrücken oder bei der Erschließung neuer Nahrungsquellen mitwirken (Van der Biezen und Jones 1998, Jones und Dangl 2006). Schließlich kommt es zur effektorvermittelten Suszeptibilität (ETS, *effector triggered susceptibility*) der Wirtspflanze (Abbildung 1-1). Weiterhin können auch unspezifische, auf Pflanzen toxisch wirkende Verbindungen sekretiert werden (Gijzen und Nürnberger 2006).

Pflanzen können die effektorvermittelte Suszeptibilität mit Hilfe von Resistenz- (R-) Proteinen überwinden. Die wirtsspezifischen R-Proteine, die für NB-LRR-Proteine kodieren, können direkt oder indirekt die Anwesenheit oder Aktivität von mikrobiellen Effektoren kontrollieren. Damit wird eine effektorvermittelte Resistenz (ETI, *effector triggered immunity*) ausgelöst, die meist mit einer hypersensiblen Zellantwort (HR, *hypersensitive response*), einem programmierten Zelltod (PCD, *programmed cell death*) und einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) assoziiert ist (Bent und Mackey 2007, Chisholm *et al.* 2006).

Diese Resistenz kann wiederum von einigen Pathogenen überwunden werden. Sie können Effektoren entwickeln, die z.B. den ETI-vermittelten Zelltod inhibieren. Im Gegenzug können neue pflanzliche R-Proteine diese Effektoren erkennen und damit eine Resistenz vermitteln. Dieser evolutionäre Wechsel zwischen Suszeptibilität und Immunität wurde in einem Zickzack-Modell veranschaulicht (Abbildung 1-1, Jones und Dangl 2006, Chisholm *et al.* 2006, Ingle *et al.* 2006).

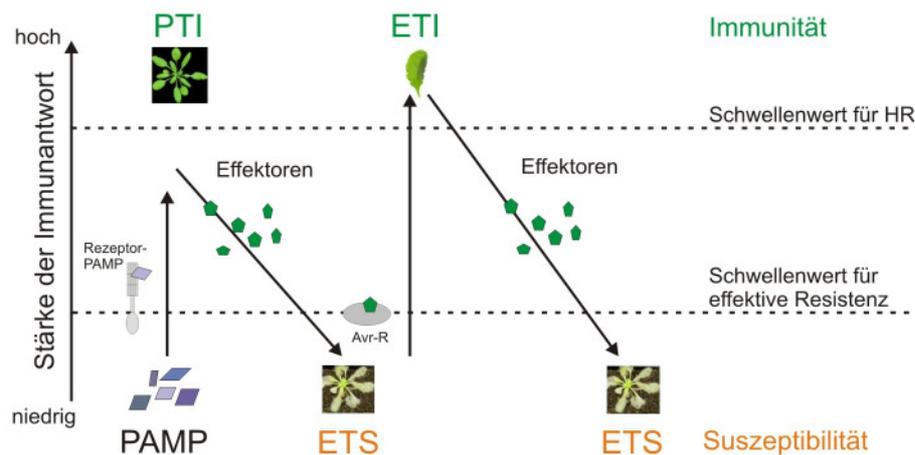


Abbildung 1-1 Evolution des pflanzlichen Pathosystems (Zickzack-Modell, entworfen nach Jones und Dangl 2006)

In Phase 1 werden Pathogene PAMP-vermittelt perzipiert. Einige erfolgreiche Pathogene entwickeln in Phase 2 Effektoren, die diese PAMP-vermittelte Immunität (PTI) suprimieren oder umgehen können. Pflanzen entwickelten wiederum in Phase 3 NB-LRR-Proteine, die zum Beispiel Avr-Proteine erkennen können. Die Ausprägung der effektorvermittelten Immunität ist eine Steigerung der PTI. (PTI PAMP-vermittelte Immunität, ETS effektorvermittelte Suszeptibilität, ETI effektorvermittelte Immunität)

Die Abwehr-Reaktionen sowie die Aktivierung von Genen wird durch ein komplexes, streng kontrolliertes Signalnetzwerk ermöglicht, in dem Protein-Phosphorylierungs-Kaskaden eine wichtige Rolle spielen. Sie verbinden diverse Sensoren mit einer großen Zahl zellulärer Reaktionen. Molekularbiologische und biochemische Analysen belegten bereits die Rolle von mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK) Kaskaden in der Signaltransduktion abiotischer (Temperatur, Trockenheit, Salinität, oxidativer Stress) und biotischer Stressfaktoren ein-

schließlich Verwundung, Hormon-Signalen (Abscisinsäure, Auxin, Jasmonsäure) und Zellteilung in Pflanzen (Ichimura *et al.* 2002, Mishra, Tuteja und Tuteja 2006, Nakagami *et al.* 2005, Tena *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2006).

1.2 MAPK-Netzwerke in Pflanzen

Die MAPK, eine spezielle Klasse der Serin/Threonin Protein-Kinasen, spielt eine fundamentale Rolle bei der Signaltransduktion. Die Vermittlung extra- und intrazellulärer Signale erfolgt im Allgemeinen in Signal-Kaskaden und –Netzwerken. Eine MAPK Kaskade besteht meist aus verschiedenen aufeinanderfolgenden MAPK, die sich sukzessive durch Phosphorylierungen aktivieren können: die MAPKK Kinase (MAPKKK) phosphoryliert eine MAPK Kinase (MAPKK), die wiederum eine MAPK phosphorylieren kann.

Das Arabidopsis-Genom kodiert für etwa 20 MAPK, 10 MAPKK und über 60 MAPKKK (Tena *et al.* 2001, Ichimura *et al.* 2002). Die MAPK stellen die finale Komponente einer MAPK Kaskade dar. Sie werden anhand des konservierten Aminosäure-Motivs TxY in den TEY-Subtyp und TDY-Subtyp unterteilt, wobei ersterer eine zusätzliche *common docking* (CD)-Domäne aufweist. Diese stellt eine mögliche Bindedomäne für MAPKK, Phosphatasen und Substrate dar (Ichimura *et al.* 2002). MAPK können je nach Aktivierungs-Zustand sowohl im Zytoplasma als auch Zellkern lokalisiert sein und Substrate wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren oder andere regulierende Enzyme phosphorylieren (Ichimura *et al.* 2002, Lee *et al.* 2004). Diese Substrate enthalten im allgemeinen Ser-Pro Motive (Sharrocks, Yang und Galanis 2000).

Tabelle 1-1 Verschiedene Funktionen der MAPK MPK3, MPK4 und MPK6 in *Arabidopsis thaliana*

<i>MPK3</i>	<i>MPK4</i>	<i>MPK6</i>
Flagellin-responsive Aktivierung (2)	Flagellin-responsive Aktivierung (8)	Flagellin-responsive Aktivierung (2)
Pilz-responsive Aktivierung (7)	Abiotischer Stress (4)	Pilz-responsive Aktivierung (7)
Oxidativer Stress (1, 5)	Osmotischer Stress (3)	Abiotischer Stress (4)
Samenanlagen-Entwicklung (10)	Negativer Regulator von Abwehrantworten (6)	Oxidativer Stress (1, 5)
Stomata-Entwicklung (9)		Samenanlagen-Entwicklung (10)
Ethylen Signalgebung (11)		Stomata-Entwicklung (9)
		Ethylen Signalgebung (11)

(1, Ahlfors *et al.* 2004; 2, Asai *et al.* 2002; 3, Droillard *et al.* 2004; 4, Ichimura *et al.* 2000; 5, Miles *et al.* 2005; 6, Petersen *et al.* 2000; 7, Ren *et al.* 2008; 8, Suarez-Rodriguez *et al.* 2007; 9, Wang *et al.* 2007; 10, Wang *et al.* 2008; 11, Yoo *et al.* 2008)

MAPK spielen in vielen Prozessen in der Pflanze eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. MPK3, MPK4 und MPK6 sind involviert in Signal-Kaskaden nach abiotischem und biotischem Stress. Teilweise spielen sie auch eine Rolle bei regulatorischen Prozessen wie der Entwicklung der Samenanlagen, Stomata oder der Ethylen Signalgebung (Tabelle 1-1).

Zu den am besten charakterisierten Signalkaskaden gehören die an der Flagellin-Perzeption beteiligten MAPK Kaskaden (Abbildung 1-2). Eine konservierte, 22 Aminosäuren lange Domäne des Flagellins ist ausreichend, um die Signalantwort in Arabidopsis auszulösen (Felix *et al.* 1999, Gómez-Goméz, Felix und Boller 1999). Nach einer flg22-Elizitierung konnten nach kurzer Zeit Calcium-Ströme, Wasserstoffperoxid-Produktion und die Aktivierung zweier MAPK-Kaskaden detektiert werden (Abbildung 1-2). In der ersten MAPK Kaskade partizipieren MEKK1, MKK1/2 und MPK4 an der Abwehrantwort auf den bakteriellen Elizitor Flagellin (Mészáros *et al.* 2006, Qiu *et al.* 2008a, Suarez-Rodriguez *et al.* 2007), eine weitere Kaskade beinhaltet die Komponenten MKK4, MKK5 sowie MPK3 und MPK6 (Abbildung 1-2 rechts, Asai *et al.* 2002).

Die Perzeption des Flagellin erfolgt über die Rezeptor-ähnliche Kinase FLS2 (*flagellin sensitive 2*, Chinchilla *et al.* 2006/2007, Gómez-Goméz, Bauer und Boller 2001). FLS2 ist homolog zur TLR (*toll like receptor*) Familie, der auch der für die Flagellin-Perzeption in Säugern verantwortliche Rezeptor TLR5 angehört (Gómez-Goméz und Boller 2002).

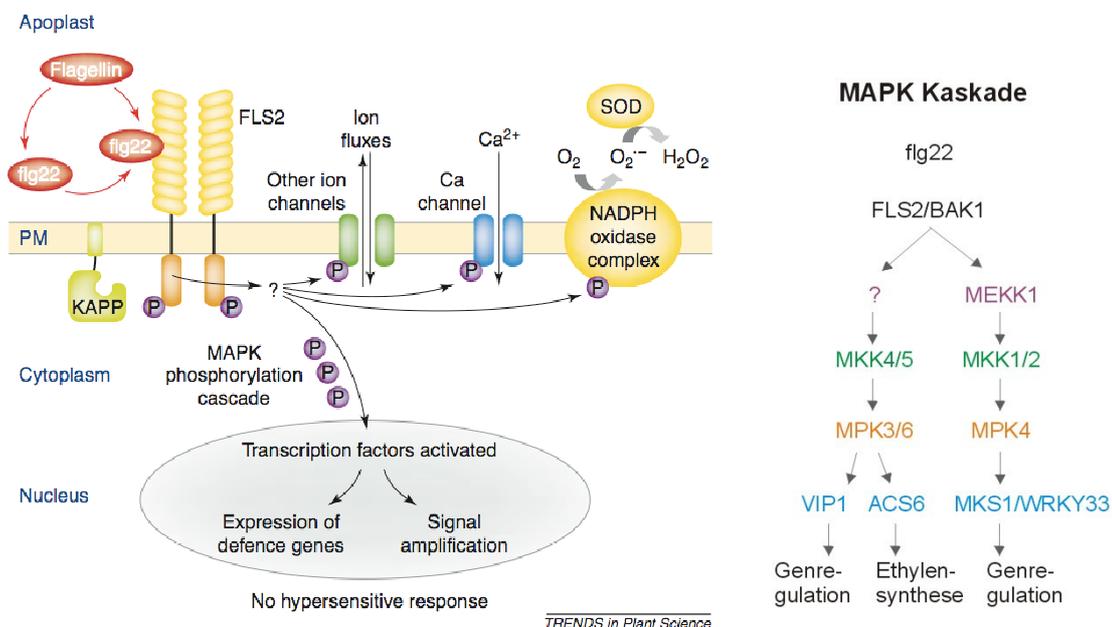


Abbildung 1-2 Modell der durch Flagellin induzierten Signale und MAPK Kaskaden (nach Gómez-Gómez und Boller 2002 und Colcombet und Hirt 2008)

Nach der Aufklärung mehrerer Signalkaskaden und derer Signal-Komponenten (Tabelle 1-1) rückte zusehends die Identifizierung von MAPK-Substraten in den Fokus des Interesses, trotzdem konnten erst wenige Substrate identifiziert werden. Mittels einer Protein-*Microarray* Strategie konnten putative Substrate von MPK3 und MPK6 identifiziert werden, von denen einige spezifisch für beide MAPK waren (Feilner *et al.* 2005, Popescu *et al.* 2009). Unter den putativen Substraten befand sich auch die ACC-Synthase 6 (ACS6), die zusammen mit der ACS2 bereits 2004 als Substrat der MPK6 identifiziert wurde (Liu und Zhang 2004). Die Phosphorylierung dieser beiden Isoformen der ACC-Synthase wirkte stabilisierend, die Akkumulation der Proteine induzierte die Bildung des Pflanzenhormons Ethylen (Joo *et al.* 2008, Liu und Zhang 2004).

Mittels Hefe-2-Hybrid Analysen und *in vitro* Methoden konnte das Substrat NDPK2 (Nukleosid-Diphosphat Kinase 2) für AtMPK3 und AtMPK6 identifiziert werden. Die Expression des NDPK2-Gens wird stark durch Wasserstoffperoxid induziert und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der H₂O₂-vermittelten MAPK Signaltransduktion in Pflanzen (Moon *et al.* 2003). Ein weiteres Substrat der MPK3 und MPK6 stellt ein phosphoryliertes Protein mit einem Molekulargewicht (MG) von 32 kDa (AtPHOS32) dar. Es wurde ursprünglich in flg22-elizitierten Zellkulturen identifiziert und hat Ähnlichkeit mit dem bakteriellen Universal-Stressprotein A (Merkouropoulos *et al.* 2008). Im Zusammenhang mit der Aufklärung des Mechanismus der Agrobakterien-vermittelten Transfektion von Arabidopsis wurde das MPK3-Substrat VIP1 (VirE2-interagierendes Protein) entdeckt. Dieser Transkriptionsfaktor lokalisiert nach der Phosphorylierung im Zellkern, wo er regulierend an der Expression des PR1-Gens beteiligt ist (Djamei *et al.* 2007). Auch der Transkriptionsfaktor EIN3 (Ethylen insensitiv 3), der in die Ethylen-Signaltransduktion involviert ist, wird durch die MPK3 und MPK6 phosphoryliert, was zu einer Veränderung der Protein-Stabilität führt (Yoo *et al.* 2008). Das Protein MPK4 funktioniert als ein negativer Regulator der Pathogen-Abwehrantworten. Es wird sowohl für die Repression der Salizylsäure-abhängigen Resistenz als auch für die Aktivierung der JA-abhängigen Expression von Abwehrgenen benötigt (Brodersen *et al.* 2006; Petersen *et al.* 2000). In Hefe-2-Hybrid Analysen konnte das MPK4-Substrat MKS1 identifiziert werden. Es wird für die volle Ausprägung der Salizylsäure-abhängigen Resistenz in *mpk4* Mutanten benötigt, eine Überexpression der MKS1 führt zu einer konstitutiven Aktivierung der Salizylsäure-abhängigen Resistenz (Andreasson *et al.* 2005, Caspersen *et al.* 2007, Qiu *et al.* 2008b).

1.3 Spezifität und Regulationsmechanismen von MAPK-Netzwerken

MAPK interagieren mit einer Reihe von Partnern – aktivierenden Kinasen, deaktivierenden Phosphatasen und Substraten. Weil in Zellen mehrere Kaskaden gleichzeitig aktiv sein können, müssen diese Interaktionen voneinander getrennt werden, damit die entsprechenden zellulären Reaktionen spezifisch von einem Stimulus ausgelöst werden können. Das MAPK-Signalnetzwerk erscheint noch komplexer, wenn man die Nutzung einzelner Signal-Komponenten in mehreren verschiedenen Kaskaden bedenkt. So sind in Arabidopsis die MAPK MPK3 und MPK6 an verschiedenen signalgebenden Prozessen beteiligt (Tabelle 1-1) und teilweise redundant. Sie werden sowohl durch biotische als auch abiotische Stressfaktoren aktiviert und spielen bei der Entwicklung von Samen und Stomata sowie der Ethylen-Signalgebung eine Rolle (Tabelle 1-1). Teilweise gibt es auch überlappende Funktionen mit der MPK4, die jedoch auch spezifisch als negativer Regulator von Abwehrantworten agiert. Nachfolgend soll auf einige Mechanismen eingegangen werden, die MAPK-Modulen Spezifität und Effizienz verleihen können.

MAPK interagieren mit ihren Substraten abseits der Kinase-Aktivität über Docking Domänen. Diese Domänen sind kurze Peptid-Sequenzen, die in einer Furche an der MAPK Oberfläche binden können (Reményi *et al.* 2005). Als Strukturelement der MAPK wurde bereits die *common docking* (CD)-Domäne erwähnt. Diese evolutionär konservierte Region befindet sich im C-Terminus der MAPK und enthält saure, im zellulären Milieu negativ geladene Aminosäuren. Die Interaktion scheint über elektrostatische Wechselwirkungen zu erfolgen, wobei basische, im zellulären Milieu positiv geladene Reste der Docking Domäne auf Substrat-Seite an der negativ geladenen Oberfläche der CD-Domäne der MAPK binden. Zusätzlich wird die Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen gestärkt (Ichimura *et al.* 2002, Reményi *et al.* 2006). Die Bindung kann u.a. Konformationsänderungen in der Kinase nach sich ziehen und zu Aktivitätsänderungen führen. Obwohl Docking Domänen feine Unterschiede kodieren und damit verschiedene Substrate spezifisch binden können (Reményi *et al.* 2005), reicht die Diversität dieser Strukturelemente nicht als einziger Mechanismus der Spezifität von MAPK Modulen aus.

Einige Signal-Komponenten werden in verschiedenen Signal-Kaskaden wiederverwendet (siehe Tabelle 1-1). Die spezifischen Reaktionen der Zelle auf extrazelluläre Stimuli können mit Hilfe verschiedener Modelle erklärt werden: (i) der physischen Abgrenzung der Signal-Komponenten, (ii) einer kombinatorischen Signaltransduktion und (iii) der Kreuz-Signalweg-Inhibierung (Schwartz und Madhani 2004).

Die physische Abgrenzung der Signal-Komponenten in unterschiedliche Zelltypen und die subzelluläre Kompartimentierung können Kreuz-Reaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen verhindern. Ebenso ist eine temporale Begrenzung der Expression oder Aktivierung durch z.B. post-translationale Modifizierungen möglich. Die Signalspezifität kann auch durch die Formierung von multimolekularen Signalkomplexen sowie die Rekrutierung an Gerüstproteine vermittelt werden (Tsunoda *et al.* 1998). Bei einer kombinatorischen Signaltransduktion ist eine Kombination oder Akkumulation extrazellulär aktivierter Signalwege für die endgültige Zellantwort nötig. Schließlich kann die Aktivierung einer Signalkaskade die Inaktivierung oder Zerstörung spezifischer Komponenten eines anderen Signalweges verursachen. Diese Kreuz-Signalweg-Inhibierung muss dabei vom Terminus ‚negativer *Cross-Talk*‘ unterschieden werden, welcher generell auf die inhibitorische Interaktionen zwischen Signalwegen, die keine gleichen Komponenten teilen, bezogen ist (Schwartz und Madhani 2004).

In Pflanzen wurde bereits die Regulation der Aktivität von MAPK durch Phosphatasen beschrieben, die mit der Dephosphorylierung auch eine temporale Begrenzung der Kinase-Aktivität gewährleisten können. So erhöht die MAPK Phosphatase 2 (MKP2) aus Arabidopsis die Toleranz gegenüber oxidativem Stress durch die Inaktivierung der MPK3 und MPK6 (Lee und Ellis 2007). Eine negative Regulation von MPK4 und MPK6 erfolgt durch AP2C1. Diese Phosphatase beeinflusst durch die Dephosphorylierung letztendlich die Pathogen-Abwehr sowie die Jasmonsäure- und Ethylen-Konzentrationen (Schweighofer *et al.* 2007). Auch die MKP1 spielt bei der Fein-Regulierung von pflanzlichen Stressreaktionen auf verschiedene Umwelteinflüsse wie einem hohen Salzgehalt und genotoxischem Stress eine Rolle (Lee *et al.* 2008, Ulm *et al.* 2002). Jedoch stehen in Arabidopsis den 23 MAPK nur 5 MKP-Proteine gegenüber, wohingegen das Verhältnis der MAPK zu Phosphatasen in anderen Eukaryoten etwa eins zu eins ist (Ulm *et al.* 2002).

1.3.1 Proteinkomplexe und Gerüstproteine als Strukturelemente

Die Bildung von multimolekularen Signalkomplexen bietet verschiedene Vorteile (Tsunoda *et al.* 1998). Die räumliche Nähe der Signal-Komponenten zueinander erhöht deren lokale Konzentration, was zu einer schnelleren Signalweiterleitung führt. Gleichzeitig werden unerwünschte Kreuzreaktionen vermieden. Gerüstproteine wirken sich ebenfalls günstig auf die Effizienz der Signaltransduktion aus (Schwartz und Madhani 2004). Diese strukturell diversen Proteine stellen aktive Komplexe mit verschiedensten Signal-Proteinen und Enzymen eines oder mehrerer Signal-Wege zusammen. Konformationsänderungen und die räumliche Ausrichtung der Komponenten unterstützen die Protein-Interaktionen und regulieren damit

Signal-Netzwerke. Gerüstproteine sind aber nicht nur passive Bindungspartner, sie können auch aktiv die Signalstärke variieren und regulieren (Bashor *et al.* 2008, Bhattacharyya *et al.* 2006a, Dard und Peter 2006).

Gerüstproteine sind sowohl in Hefen als auch in Säugern als zentrale Elemente der Signaltransduktion bekannt. So bindet Ste5, ein Gerüstprotein aus Hefe, simultan verschiedene Komponenten einer MAPK Kaskade (Ste11, Ste7, Fus3) um den Paarungs-Mechanismus zu kontrollieren. Dabei hat das Gerüstprotein auch Einfluss auf die katalytische Aktivität der MAPK Fus3 (Bhattacharyya *et al.* 2006b). Ste11, Ste7 und die MAPK Kss1 bilden Ste5-unabhängig ein MAPK Modul, das in der osmotischen Stressantwort eine Rolle spielt (Andersson *et al.* 2004, Park *et al.* 2003).

In Arabidopsis gibt es bisher keine bekannten Gerüstproteine, die in der Signaltransduktion von MAPK eine Rolle spielen. Es gibt jedoch erste Indikationen, dass MAPKKK neben der Kinase-Funktion auch als Strukturelement dienen können (Ichimura *et al.* 1998; Nakagami *et al.* 2006; Suarez-Rodriguez *et al.* 2007). Die MAPKKK OMTK1, die in Arabidopsis am nächsten mit MEKK1 verwandt ist, spielt in Luzerne eine Rolle als strukturbildendes Element. Sie bildet nach H₂O₂-Induktion *in vivo* einen Komplex mit der MAPKK MMK3, was zur Aktivierung des Zelltods in Pflanzen führt (Nakagami *et al.* 2006).

Eine MAPKKK aus Arabidopsis, MEKK1, untergliedert sich in eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale Kinase-Domäne. Letztere interagiert in einem Hefe-2-Hybrid Ansatz mit der MAPKK MKK1 und der MAPK MPK4 (Ichimura *et al.* 1998). Die durch flg22-induzierte Aktivierung der MPK4 ist abhängig von dem Strukturelement MEKK1, jedoch scheinbar nicht von der MEKK1 Kinase-Aktivität (Suarez-Rodriguez *et al.* 2007).

Im Gegensatz dazu ist die flg22-induzierte Aktivierung der MPK3 und MPK6 vollkommen MEKK1 unabhängig. Diese Signal-Kaskade scheint auch als unabhängiger Proteinkomplex strukturiert vorzuliegen. Mittels Größenausschluss-Chromatographie und Immuno-Detektion verschiedener Fraktionen konnte bereits gezeigt werden, dass die finalen Komponenten dieser Kaskade, MPK3 und MPK6, in löslichen Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern und Zellkulturen wahrscheinlich mit anderen zellulären Proteinen interagieren (Schlichting 2007).

Die Existenz weiterer Gerüstproteine und anderer regulatorisch wirkender MAPK Interaktoren in Pflanzen ist wahrscheinlich, da sie in der eukaryotischen Signaltransduktions-Maschinerie konserviert und ubiquitär verbreitet sind. Allerdings können aufgrund der großen strukturellen Diversität Sequenz-Homologien nicht speziesübergreifend zur Identifikation

neuer pflanzenspezifischer, funktionell analoger Proteine genutzt werden. Aus diesen Gründen kann die Identifikation weiterer Gerüstproteine aus *Arabidopsis* nur mittels biochemischer Interaktionsstudien erreicht werden.

1.4 Möglichkeiten der Proteom-Analyse zur Identifizierung von Signal-Netzwerken

Das *Arabidopsis*-Genom wird mit einer Größe von 32.943 proteinkodierenden Sequenzen angegeben (TAIR8, www.arabidopsis.org/servlets/processor?type=tablestats 23.02.2009). 13.000 Proteine konnten bereits in einer groß angelegten Proteomics-Studie detektiert werden (Baerenfaller *et al.* 2008). Es wird jedoch angenommen, dass die Zahl funktionaler Proteine in einem Bereich von 200.000 bis 2 Millionen liegt (Rose *et al.* 2004).

Eine Proteom-Analyse erfolgt unter verschiedenen Gesichtspunkten. Einerseits sollen möglichst alle Proteine identifiziert werden, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen exprimiert vorliegen. Andererseits werden bestimmte Vorgänge auf subzellulärer Ebene analysiert um zum Beispiel Protein-Interaktions-Netzwerke aufzuklären. Dafür wurden bereits diverse Techniken etabliert. Zu den eher konventionellen und meist zeitintensiven Methoden zählen die Flüssigchromatographie (LC), Zucker-Dichtegradienten- und Ultra-Zentrifugation. Weiterhin werden ein- oder mehrdimensionale Reinigungsmethoden wie Größenausschluss-Chromatographie, 2D-Gelelektrophorese und *blue native* Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt (Blackstock und Mann 2000, Camacho-Carvajal *et al.* 2004), denen eine Separierung der Proteine nach ihren physikochemischen Eigenschaften zugrunde liegt.

Verschiedene Technologien der *functional proteomics* ermöglichen einen komplementären Blick auf das Proteom einer Zelle basierend auf (i) native Affinitäts-Reinigungen von Proteinen, (ii) paarweisem Testen von Interaktionspartnern (biochemische Automatisierung oder Chip-Technologien), (iii) genetische *read out*-Systeme (Hefe-2-Hybrid, *phage display*) und (iv) computergestützte Vorhersage-Algorithmen (teilweise basierend auf 3D-Strukturen und Binde-Motiven) (Köcher und Superti-Furga 2007, Lalonde *et al.* 2008).

Die affinitätsbasierten Methoden bieten dabei eine effiziente Anreicherung von Zielprotein-komplexen. Unter diesen nicht-denaturierenden Reinigungsmethoden befinden sich die Ko-Immunopräzipitation (co-IP, Williams 2000), Epitop-Markierungen sowie der GST-*pull-down* (Smith und Johnson 1988).

1.4.1 Affinitäts-Reinigung von Proteinkomplexen

Die Methode der Epitop-Markierung wurde erstmals 1984 beschrieben (Munro und Pelham 1984). Die Strategie beinhaltet die genetische Fusion eines Zielproteins mit einem Epitop-Tag, dessen Komplex nach Expression *in vivo* über die Bindung des Tags (z.B. His, Calmodulin-bindendes Peptid, StrepII, TAP) oder Immunoaffinität (z.B. FLAG, HA, c-Myc) an einer Matrix angereichert werden kann. Die Elution kann dann spezifisch zum Beispiel mit einem Epitop-Tag Analogon erfolgen (Lichty *et al.* 2005, Yang *et al.* 2008).

Ein Vorteil bei der Nutzung der Epitop-Tag-Strategie liegt in der Effizienz und dem Zeitfaktor. Nachdem der Epitop-Tag genetisch mit den Ziel-Genen fusioniert wurde, können schnell verschiedene Transformanten generiert werden. Dabei ist auch eine Überexpression der Zielproteine durch geeignete Promotoren-Wahl möglich. Der ideale Epitop-Tag ist klein und ermöglicht eine effiziente und flexible Protein-Anreicherung mit hohen Ausbeuten und geringer Kontamination, was die Identifizierung von Interaktoren erleichtert. Artifiziiell eingeführte Epitop-Tags können jedoch auch einen Einfluss auf die Proteinfaltung und Komplexintegrität sowie die Protein-Funktion haben. Weitere Nachteile bei der Epitop-Tag Strategie können repetitive und zeitintensive Waschschriffe sein sowie nicht-physiologische Konditionen, die zum Verlust der Integrität von Protein-Komplexen führen können, vor allem wenn die Protein-Interaktionen nur sehr schwach oder transient sind (Lichty *et al.* 2005, Terpe 2003, Yang *et al.* 2008).

Ein Epitop-Tag, der verschiedene der beschriebenen Anforderungen erfüllt, ist der StrepII-Epitop-Tag (Witte *et al.* 2004). Er besteht aus einem Oktapeptid (WSHPQFEK) und ermöglicht eine zeitsparende Einschriff-Reinigungsstrategie (Abbildung 1-3) unter physiologischen Konditionen sowie ein einfaches *up-scaling*. Der strepII-Tag bindet hochaffin an Strep-Tactin, ein an drei Aminosäuren mutiertes Streptavidin-Derivat. Unspezifisch bindende biotinylierte Proteine und Biotin selbst können durch Zugabe von Avidin blockiert werden. Die Reinigungs-Bedingungen können variabel gestaltet werden, die strepII-Reinigungsstrategie verträgt Chelatoren sowie milde und reduzierende Detergenzien. Die Elution erfolgt kompetitiv über die Verdrängung des StrepII-Tag durch (Desthio-) Biotin (Abbildung 1-3), der Reinigungsvorgang kann über die Detektion des StrepII-Epitop-Tags durch Immuno-Blot-Analysen nachverfolgt werden. Einen weiteren Vorteil stellt die Möglichkeit zur Regenerierung der Strep-Tactin-Matrix mittels 4-Hydroxy-Azobenzen-2-Carboxylsäure dar (Skerra und Schmidt 2000, Terpe 2003, Witte *et al.* 2004).

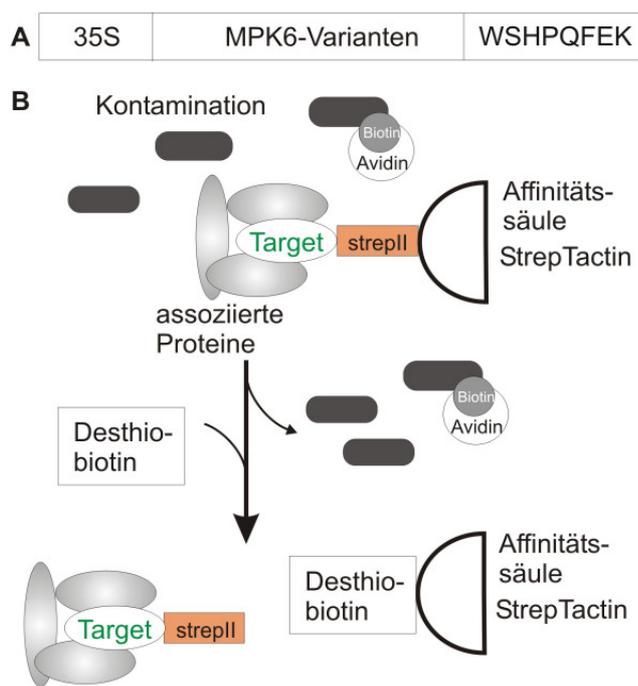


Abbildung 1-3 StrepII-Strategie (Witte *et al.* 2004)

(A) Schematische Darstellung des StrepII-Fusionskonstruktes (in dieser Arbeit mit Varianten der MPK6) mit dem konstitutiven 35S-Promotor und einer C-terminalen StrepII-Markierung (B). Die Proteinreinigung erfolgt über eine StrepTactin-Affinitätsmatrix in einer Einzschritt-Strategie.

Obwohl die Einzschritt Affinitäts-Proteinreinigung bei der Anreicherung von Proteinkomplexen sehr effektiv sein kann, können viele unspezifisch an die Matrix bindende Kontaminanten Probleme bei der Identifizierung von Interaktionspartnern verursachen. Die 1999 eingeführte Zwei-Schritt-Strategie der *Tandem Affinity Purification* (TAP) zielte auf eine geringere Kontamination der angereicherten Proteine ab (Rigaut *et al.* 1999, Tagwerker *et al.* 2006). Der ursprünglich für die Reinigung von Hefeproteinkomplexen entwickelte TAP-Epitop-Tag besteht aus zwei IgG-Bindedomänen (Protein A aus *Staphylococcus aureus*) und einem Calmodulin-Bindepeptid (CBP), die durch eine Schnittstelle der TEV-Protease (*tobacco etch virus*) separiert sind (Abbildung 1-4 A). Die Proteinreinigung erfolgt auch hierbei unter physiologischen Konditionen. Die Reinigungsbedingungen können in Bezug auf milde und reduzierende Detergenzien variabel gestaltet werden. Nach einer Elution der IgG-Matrix mit Hilfe der TEV-Protease können die an der Calmodulin-Matrix immobilisierten Proteine aufgrund der hohen Affinität relativ stringent gewaschen werden. Die Proteine werden schließlich über eine Chelatierung der zur Bindung benötigten Calcium-Ionen eluiert (Abbildung 1-4 C).

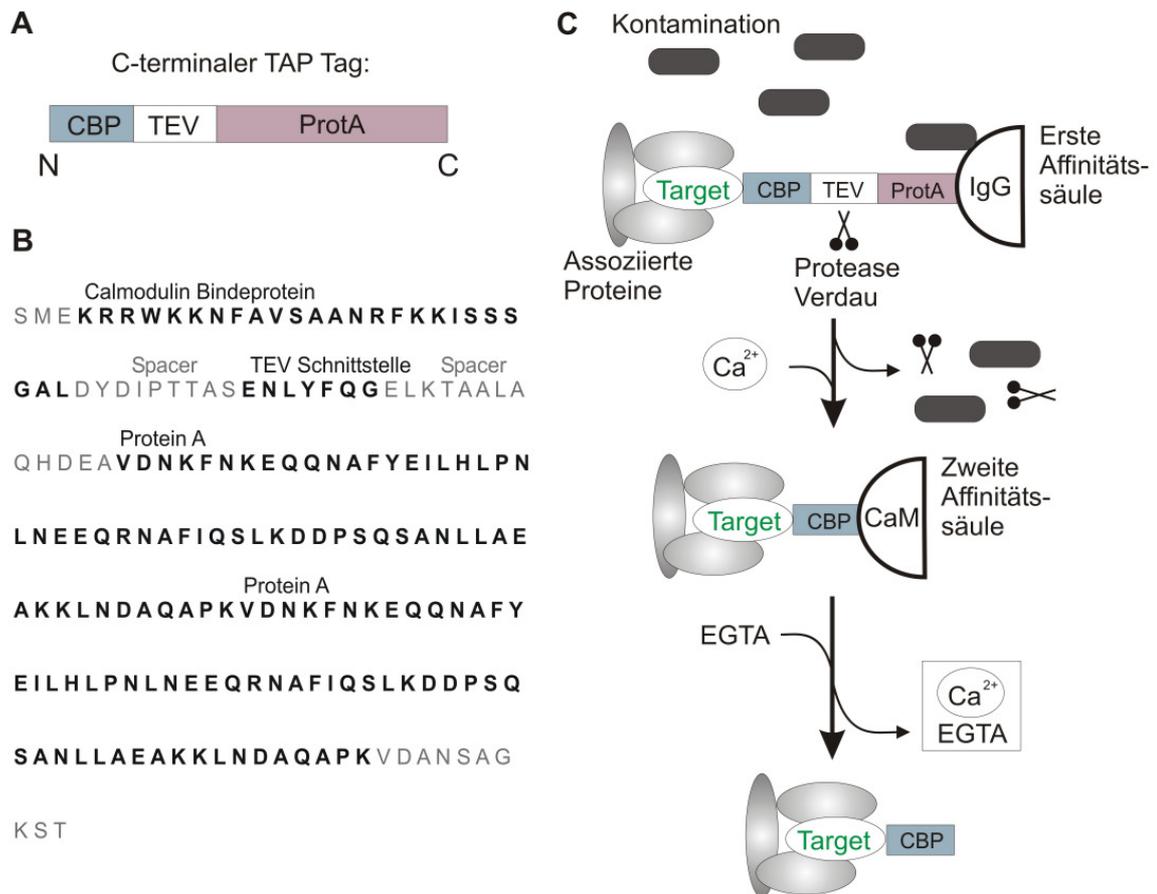


Abbildung 1-4 TAP-Strategie (Rigaut *et al.* 1999)

Darstellung des C-terminalen TAP-Tag als Schema (A) und die Aminosäuresequenz (B). Die Proteinreinigung erfolgt in einer Zwei-Schritt-Strategie. Die an die IgG-Affinitätsmatrix gebundenen Proteine werden spezifisch mittels TEV Protease Verdau eluiert und in Gegenwart von Calcium-Ionen an einer CaM-Affinitätsmatrix immobilisiert. Die Elution erfolgt durch die Chelatierung der zur Bindung benötigten Calcium-Ionen.

1.4.2 Identifizierung und Validierung von Signal-Komplexen

Die Kombination der Affinitäts-Chromatographie mit Massenspektrometrie ermöglicht nicht nur die Identifizierung neuer Komponenten von Protein-Komplexen (Collins und Choudhary 2008), sondern auch die Analyse von post-translationalen Proteinmodifikationen. Die angereicherten Proteine können anschließend über gel-basierte Quantifizierungen (1D/2D-PAGE) analysiert werden. Gelfreie Strategien sind jedoch im allgemeinen schneller, so dass sie zunehmend zum Einsatz kommen. Die Proteine werden gegebenenfalls aufkonzentriert und proteolytisch gespalten, wobei die Proteasen Trypsin, Lys-C, Asp-N oder Glu-C eingesetzt werden (Steen und Mann 2004, Gingras *et al.* 2007).

Die generierten Peptidgemische können je nach Komplexität direkt oder nach einer Peptid-separation über eine HPLC oder einen Ionenaustauscher massenspektrometrisch analysiert werden. Die Peptide können durch die Elektrospray-Ionisation (ESI) oder die Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) ionisiert und anschließend in verschiedenen

Massenspektrometern (Analysatoren: Quadrupol, *Time-of-flight* (TOF), Ionenfalle (IT - *ion trap*)) analysiert werden. Schließlich werden die erhaltenen Peptid-Sequenzdaten mit Hilfe von Suchprogrammen mit den *in silico* verdauten Proteinfragmenten einer Datenbank verglichen und somit Proteine identifiziert (Steen und Mann 2004).

Aus den Spektren einer MALDI-TOF-MS resultiert eine Liste von Peptidmassen, die mit den charakteristischen PMF (*peptide mass fingerprint*) der Proteine verglichen werden können. Diese Methode eignet sich zu einer relativ einfachen Identifizierung von wenig komplexen Protein- bzw. Peptid-Gemischen. Sie zeichnet sich durch eine hohe Massengenauigkeit und geringen Zeitaufwand aus (Aebersold und Mann 2003). Mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation können Moleküle sehr schonend ionisiert werden. Durch die Kopplung mit einer vorgeschalteten Flüssig-Chromatographie und einem Tandem-Massenspektrometer können auch komplexere Peptid-Gemische analysiert werden. Einen weiteren Vorteil der Tandem-MS (MS/MS) stellt die Möglichkeit der Sequenzierung von abundanten Peptiden dar, die nach einem ersten MS-Scan spezifisch selektiert und in einer weiteren MS fragmentiert und analysiert werden können. Die Kenntnis der Peptidsequenzen erhöht die Wahrscheinlichkeit der Protein-Identifizierungen.

Schließlich werden mit Hilfe der massenspektrometrischen Analysen Protein-Listen erstellt, die die in der Ausgangsprobe enthaltenen Epitop-markierten sowie interagierenden Proteine und Kontaminanten einschließen (Blackstock und Mann 2000, Gingras *et al.* 2007, Van Wijk 2001). Die Validierung der identifizierten putativen Interaktoren erfolgt im allgemeinen über den Vergleich der Daten aus weiteren *in vitro* und *in vivo* Strategien, wie zum Beispiel der Ko-Immunopräzipitation, dem GST-*pull-down*, Hefe-Zwei-Hybrid Techniken sowie fluoreszenzbasierten Methoden (z.B. FRET, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) (Eubel, Braun und Millar 2005, Mierny und Thelen 2008, Yang *et al.* 2008).

Eine schnelle, nicht-invasive Methode zur Analyse von Protein-Interaktionen stellt die Methode der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation dar (BiFC, Kerppola 2006, Kerppola 2008, Walter *et al.* 2004). Dabei wird das YFP (*yellow fluorescent protein*) genutzt, das in zwei Fragmente gespalten wird. Die Interaktion zweier Proteine, die mit je einem YFP-Fragment fusioniert sind, führt zu einer Wiederherstellung des gespaltenen Fluorophors, das durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann. Mit dieser Methode können nicht nur Protein-Interaktionen *in vivo* validiert, sondern auch deren subzelluläre Lokalisation detektiert werden. Einen weiteren Vorteil stellt die Stabilisierung von transienten Protein-Komplexen dar, da die Zusammenlagerung der beiden YFP-Fragmente stabil ist.

1.5 Zielsetzung

Um mit der Umwelt interagieren und auf deren Veränderungen reagieren zu können, müssen Lebewesen Mechanismen zur Perzeption und Weiterleitung von Reizen und Signalen besitzen. Die Vermittlung extra- und intrazellulärer Signale erfolgt im Allgemeinen durch Signal-Kaskaden und –Netzwerke. Dabei spielen MAPK in der Signaltransduktion eine fundamentale Rolle. Bei dem vielfältigen pflanzlichen Set an Signalkaskade-Komponenten ist die Spezifität und Regulation dieser Maschinerie essentiell (Mishra, Tuteja und Tuteja 2006, Zhang *et al.* 2006). Sowohl in Hefen als auch in höheren Eukaryoten sind u.a. Gerüstproteine als zentrale Regulations-Elemente der Signaltransduktion bekannt, deshalb wird auch für Pflanzen das Vorhandensein solcher Struktur-Elemente postuliert (Dard und Peter 2006, Suarez-Rodriguez *et al.* 2007).

Die durch das pathogenassoziierte Molekülmuster Flagellin induzierte Signal-Maschinerie gehört zu den am intensivsten untersuchten zellulären Vorgängen in *Arabidopsis thaliana*. So konnten sowohl Rezeptoren als auch die Signal-Kaskaden über Hefe-Zwei-Hybrid Analysen und durch die Untersuchung von *Knock out* Mutanten identifiziert werden (Goméz-Goméz, Bauer und Boller 2001, Ichimura *et al.* 1998, Qiu *et al.* 2008a, Tena *et al.* 2001). Für die in diesen MAPK Signal-Modulen involvierten MPK3, MPK4 und MPK6-Proteine konnten ebenfalls in einer Hefe-2-Hybrid Studie (Kooperation mit J. Uhrig, Daten unveröffentlicht) und in Proteinarrays (Feilner *et al.* 2005, Popescu *et al.* 2009) putative Interaktoren identifiziert werden. Diese konnten bereits teilweise validiert werden (Kuhle 2008, Bethke *et al.* 2009). Weitere Hefe-2-Hybrid Analysen mit der MAPKKK MEKK1 sowie *Micro-Array*-Analysen von *mpk3* und *mpk6 Knock-Out* Pflanzen erfolgten parallel zu dieser Arbeit.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Affinitätschromatographie von Pathogen-induzierten MAPK Signalkomplexen aus *Arabidopsis thaliana* mittels TAP- und strepII-Epitoptag. Da die generierten transgenen Zellsuspensionskulturen nicht den gestellten Anforderungen entsprachen wurden stabile Pflanzen-Transformanten eingesetzt. Nach der funktionellen Charakterisierung der Transformanten erfolgte die Durchführung und Optimierung der Tandem- und der StrepII-Affinitätschromatographie. Diese wurde mit der massenspektrometrischen Analyse der angereicherten Proteine gekoppelt.

Schließlich sollte ein Abgleich der erzielten Ergebnisse mit anderen MAPK-Interaktions-Studien und die Analyse der ko-eluierten Proteine putativ mit MAPK assoziiert vorliegende Proteine identifizieren und validieren. Die Vernetzung aller aus den verschiedenen Strategien erhaltenen Daten sollte letztendlich neue Einblicke in die Regulationsmaschinerie der MAPK Signaltransduktion in Pflanzen gewähren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Laborchemikalien besaßen p.A. Qualität und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: GE Healthcare (Freiburg), Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma Aldrich (Steinheim). Organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Roth, Calbiochem (Bad Soden), Sigma Aldrich und Merck bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien nebst Antibiotika wurden von Difco Lab. (USA), Duchefa (Niederlande), Serva (Heidelberg) und Sigma Aldrich (Steinheim) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten kamen von Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Sigma Aldrich und Promega (USA). Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die radioaktiv markierten Nukleotide wurden von MP Biomedicals (Eschwege) bezogen.

2.2 Kulturbedingungen von Bakterien

2.2.1 Anzucht von Bakterien

Das Bakterium *Escherichia coli* wurde in LB-Medium [10 g l⁻¹ Pepton; 5 g l⁻¹ Hefe-Extrakt; 5 g l⁻¹ NaCl], SOB-Medium [20 g l⁻¹ Bacto-Trypton; 5 g l⁻¹ Bacto-Hefe-Extrakt; 0,5 g l⁻¹ NaCl; 2,5 M KCl; pH 7] oder auf Platten [Medium mit 1,5% (w v⁻¹) Agar] bei 37°C kultiviert.

E.coli wurden in verschiedenen Kulturgrößen (400 bis 1000 ml) zur Expression rekombinanter Proteine angezogen. Wenn die Bakterienkultur eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreichte, erfolgte die Induktion der Proteinexpression bei 30°C durch Zugabe von IPTG (1 mM) über einen Zeitraum von 4h. Aus einer 1000 ml Kultur konnten etwa 8 g Bakterien geerntet werden.

Das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* wurde in YEP-Medium [10 g l⁻¹ Bacto-Pepton, 10 g l⁻¹ Hefe-Extrakt, 5 g l⁻¹ NaCl] oder auf YEP-Platten [YEP-Medium mit 1,5% (w v⁻¹) Agar] bei 28°C kultiviert.

Tabelle 2-1 Bakterienstämme

Stamm	Wesentliche Merkmale	Referenz
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 (pMP90RK)	Rif ^R , Gm ^R , Kan ^R	Koncz <i>et al.</i> 1986
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA, supE44, λ , thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm	GE Healthcare

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Bakterien (*E.coli*) wurden in einer 250 ml Kultur in SOB-Medium mit 10 mM MgCl₂ bei 18°C unter heftigem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min bei 4°C wurde das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer [10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂; 10 mM MgCl₂; pH 6,7; steril-filtriert] vorsichtig resuspendiert und wiederum 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation, nach der das Pellet sehr vorsichtig in 20 ml TB-Puffer resuspendiert und steriles DMSO sukzessive bis zu einer Konzentration von 7% (v v⁻¹) zugegeben wurde. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 4°C wurden Aliquots von 0,1 ml sofort in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3 Transformation von Bakterien

Die chemisch kompetenten *E.coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µg DNA für 15-30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Bakterien mit 1 ml Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika.

Chemisch kompetente *A. tumefaciens* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µg DNA für 5 min in flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach einem fünfminütigen Hitzeschock bei 37°C wurden die Bakterien mit 1 ml Antibiotika freiem YEP-Medium versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Die Selektion erfolgte auf YEP-Platten mit den entsprechenden Antibiotika.

2.3 Kulturbedingungen von *Arabidopsis thaliana*

2.3.1 Anzucht der Pflanzen

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden in klimatisierten Phytokammern (23°C, Lichtstärke 250 µmol m⁻² s⁻¹) beziehungsweise im klimatisierten Gewächshaus aufgezogen. Vegetatives Wachstum der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Tag/16 h Nacht), generatives Wachstum unter Langtagbedingungen (16 h Tag/8 h Nacht). Das Kultursubstrat bestand aus 60% Eintopferde GS90 und 40% Vermiculit. Für die Arbeiten wurden die in Tabelle 2-2 aufgeführten stabilen *Arabidopsis thaliana* Transformanten sowie die entsprechenden Wildtypen verwendet.

Tabelle 2-2 Stabile transgene Pflanzenlinien und Zellsuspensionskulturen

<i>Pflanzen</i>	<i>At Ökotyp, genetischer Hintergrund</i>	<i>Referenz</i>
<i>mpk3</i>	Col-0	B. Ellis (University of British Columbia, Vancouver, Kanada)
<i>mpk4</i>	Ler-0	J. Mundy (Petersen <i>et al.</i> 2000)
<i>mpk6</i>	Col-0	SALK Institute Ca, USA (Linie 127507)
MPK3-TAP	<i>mpk3</i>	(Spielau 2004)
MPK4-TAP	<i>mpk4</i>	diese Arbeit
MPK6-TAP	<i>mpk6</i>	(Spielau 2004)
EV TAP	Col-0	(Spielau 2004)
<i>Zellkultur</i>	<i>A.thaliana Ökotyp bzw. genetischer Hintergrund</i>	<i>Referenz</i>
MPK3-TAP	Ler-0	(R. Schlichting)
MPK6-TAP	Ler-0	diese Arbeit
EV TAP	Ler-0	(R. Schlichting)

2.3.2 Anzucht der Zellsuspensionskultur

Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Ler-0 wurden in MS-1 Medium [4,41 g l⁻¹ Murashige und Skoog (MS) Medium, 0,5 mg l⁻¹ NES, 0,05 mg l⁻¹ Kinetin, 30 g l⁻¹ Saccharose; Gamborg B5 Vitamine; 1 mg l⁻¹ 2,4 D; pH 5,7] kultiviert. Kolben wurden mit je 40 ml Suspensionskultur im Dunkeln bei 25°C geschüttelt (120 U min⁻¹), die Subkultivierung erfolgte wöchentlich. Dadurch konnten Aggregate und Einzelzellen effektiv selektiert werden.

2.3.3 Pflanzen-Transformation und Selektion

Die stabile Transformation von adulten blühenden *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der floralen dip-Methode (Clough und Bent 1998). Hierfür wurde eine 400 ml *Agrobacterium tumefaciens* Kultur, die das entsprechende Plasmid enthielt, in YEP-Medium [Selektionsmarker: 10 µg ml⁻¹ Gentamycin, 50 µg ml⁻¹ Kanamycin, 100 µg ml⁻¹ Rifampicin] bei 28°C für 16 h geschüttelt. Nach Zentrifugation (1.400× g, 15 min) wurde das Pellet in frisch hergestellter 5%iger Saccharoselösung bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 resuspendiert. Kurz vor dem Dippen wurden 0,05% (v v⁻¹) des Surfactants Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) zugegeben. Die Blütenstände der zu infiltrierenden Pflanzen wurden nun fünf Sekunden in die Agrobakterien-Lösung getaucht. Zur Regeneration lagen die Pflanzen anschließend eine Nacht horizontal in einem kleinen Gewächshaus mit erhöhter Luftfeuchtigkeit. Nach weiteren zwei bis drei Wochen konnten Samen geerntet werden.

Die MPK4-TAP Transformanten wurden durch die Kreuzung der *mpk4* Mutante mit transgenen MPK4-TAP im Ler-0 Wildtyp-Hintergrund generiert.

Die Nomenklatur der Samen und Pflanzen orientierte sich an den zu infiltrierenden Pflanzen, die als T₀-Generation bezeichnet werden. Diese Klassifikation der Transformanten-Linien erfolgte analog zu Ken Feldmann (Koncz *et al.* 1992).

Die Expression des auf dem Plasmid kodierten Bar-Gens verleiht den Transformanten eine Resistenz gegen das Herbizid Ammonium-Glufosinat (C₅H₁₅N₂O₄P, BASTA), mit Hilfe dessen sie selektiert wurden. Die Samen wurden nach der Aussaat für 24 h im Kühlraum bei 4°C stratifiziert um die Keimung zu induzieren. Einwöchige Keimlinge wurden mit 200 µM BASTA-Lösung (Bayer) besprüht. Diese Prozedur wurde in Intervallen von drei Tagen wiederholt. BASTA-resistente Pflanzen wurden zur weiteren Analyse auf Erde pikiert.

2.3.4 Transformation von Zellsuspensionskulturen und Selektion

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Ler-0 Zellsuspensionskultur erfolgte nach Forreiter und Kirschner (1997) mit marginalen Veränderungen. Zweitägige Suspensionskulturen (3 ml) inkubierten mit 200 µl gewaschenen Agrobakterien (OD₆₀₀ = 1) und 200 µM Acetoseringone für 48 h bei 25°C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen auf einem Nylon-Netz gewaschen [MS-1 Medium, 500 µg ml⁻¹ Carbenicillin, 500 µg ml⁻¹ Vancomycin] und auf Agarplatten [0.8% (v v⁻¹) Pflanzenagar in MS-1] verteilt. Die entstehenden Kalli wurden nach zwei bis drei Wochen auf Agarplatten mit dem Selektionsmarker 5 mg l⁻¹ Bialaphos umgesetzt. Die selektierten Kalli wurden schließlich in MS-1 Medium mit Bialaphos überführt.

2.3.5 Protoplastenpräparation und Transfektion

Die Präparation von Protoplasten aus *Arabidopsis* Mesophyllzellen erfolgte nach Jen Sheen (http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/protocols_reg.html, 06.04.09) mit leichten Abwandlungen.

Die Enzymlösung [1% (w v⁻¹) Zellulase Onozuka R-10 (Serva); 0,3% (w v⁻¹) Macerozym R-10 (Serva); 500 mM Mannitol; 4 mM CaCl₂; 5 mM MES/KOH; pH 5,6] wurde 10 min bei 50°C präinkubiert und steril filtriert (0,45 µm). Die untere Epidermis von *Arabidopsis*-Blättern wurde entfernt und die Blätter anschließend in der Enzymlösung kleingeschnitten und nach einer einminütigen Vakuum-Infiltration für 2-4 h schüttelnd inkubiert. Die Protoplasten-Suspension wurde durch ein Sieb (100 µm) filtriert und die pelletierten Protoplasten (150 ×g, 5 min) in 4 ml W5-Waschlösung [154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 5 mM Glucose; 1,5 mM MES/KOH; pH 5,6] resuspendiert. Nach Auszählung mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurden die Protoplasten in MaMg-Lösung [400 mM Mannitol; 15 mM

MgCl₂; 5 mM MES/KOH; pH5,6] mit einer Endkonzentration von 2×10^5 Zellen ml⁻¹ aufgenommen.

100 µl der Protoplasten-Suspension wurden mit 5 µg CFP-Plasmid-DNA und jeweils 10 µg der Plasmid-DNA gemischt und nach Zugabe von 100 µl PEG-Lösung [40% (v v⁻¹) PEG4000; 400 mM Mannitol; 100 mM Ca(NO₃)₂] für 5-10 min bei RT inkubiert. Nach einer schrittweisen Verdünnung mit 3 ml W5-Waschlösung und einer Zentrifugation (150 ×g, 5 min) wurden die Protoplasten in 2 ml W5-Waschlösung mindestens 18 h horizontal in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgten die mikroskopische Analyse der Protoplasten.

2.3.6 Kreuzen

Die Kreuzung erfolgte mit unter Langtagbedingungen angezogenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Zunächst wurden alle befruchteten Blüten, deren Fruchtblatt bereits mit Blütenpollen bedeckt war, entfernt. Ausgewählte unbefruchtete Blüten wurden nun mit Hilfe einer Kreuzungspinzette geöffnet und die Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt, ohne eine Selbstbefruchtung dabei auszulösen. Solchermaßen vorbereitete Blüten dienten als maternale Elternpflanze und wurden mit reifen Staubblättern eines Kreuzungspartners bestäubt. Die erfolgreiche Befruchtung war nach etwa drei Tagen anhand der Ausbildung der Samenanlagen sichtbar.

2.3.7 Elizitorbehandlung mit dem flg22-Peptid

Zur Elizitierung von *Arabidopsis* Pflanzen und Zellsuspensionkulturen wurde das Peptid flg22 (Sequenz QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA, Gómez-Gómez, Felix und Boller 1999) verwendet. Die Blätter von fünfwöchigen *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit Hilfe einer Spritze mit dem Peptid flg22 (10 µM) inokuliert. Nach zehn Minuten wurden die Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zellsuspensionskulturen wurden für zwei Stunden mit frischem Medium gewaschen. Dazu wurden die Kulturen mit Hilfe eines Büchner-Trichters abfiltriert und auf ein Gramm Zellen pro 10 ml Medium eingestellt. Nach dem Waschen wurde die Kultur mit 100 nM des Peptides flg22 für zehn Minuten geschüttelt, anschließend geerntet und rasch in flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmide

Tabelle 2-3 Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Wesentliche Merkmale</i>	<i>Referenz</i>	<i>Verwendungszweck</i>
pCB302	RK2 ori, nptIII, MCS1, MCS2, Tnos-Promotor-bar-Pnos-Terminator	Xiang <i>et al.</i> 1999	Pflanzentransformation
pDONR221	ccdB-Kassette, Kan ^R	Invitrogen	Klonierung
D-TOPO/pENTR	attL-sites, Kan ^R	Invitrogen	Klonierung
pE-SPYNE	CaMV 35S-Promotor, ccdB,	Walter <i>et al.</i>	Protoplasten-Transfektion
pUC-SPYNE	N-terminales Fragment von YFP, c-Myc-Epitoptag, Amp ^R	2004	
pE-SPYCE	CaMV 35S-Promotor, ccdB,	Walter <i>et al.</i>	Protoplasten-Transfektion
pUC-SPYCE	C-terminales Fragment von YFP, c-Myc-Epitoptag, Amp ^R	2004	
pENSG-CFP	CaMV35S-Promotor, ccdB, CFP, Amp ^R	R. Panstruga, MPIZ Köln	Protoplasten-Transfektion

2.4.2 Klonierung mit dem Gateway System

Die Klonierungsarbeiten wurden mit Hilfe des Gateway-Systems (Invitrogen) durchgeführt. Die vollständigen Zielgene wurden mittels PCR amplifiziert und laut Herstellerangaben in die Donor-Vektoren pDONR221 bzw. pENTR/D-TOPO kloniert. Mittels LR-Reaktion konnten diese Sequenzen anschließend in verschiedene weitere Zielvektoren kloniert werden. Als Expressionsvektoren für die BiFC-Analysen dienten pE-SPYCE, pE-SPYNE, pUC-SPYCE und pUC-SPYNE (Tabelle 2-3).

2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Zur Isolation von Plasmiden wurden 5 ml ÜN-Kulturen (*E.coli*) geerntet. Die pelletierten Bakterien wurden anschließend in 300 µl Puffer 1 [50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg ml⁻¹ RNase A; pH 8] resuspendiert und mit 300 µl Puffer 2 [200 mM NaOH; 1% (v v⁻¹) SDS] aufgeschlossen. Nach der Neutralisation mit 300 µl Puffer 3 [3 M Kaliumacetat, pH 5,5] wurden Zelltrümmer und ausgefallene Proteine abzentrifugiert und der Überstand mit 0,8 Vol. Isopropanol versetzt. Nach dem Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol und einer Trocknung bei RT wurde die DNA in 30-50 µl TE [10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8] gelöst.

Zur Isolation von Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurden Plasmid-Präparationskits der Firmen Qiagen (Hilden) und Invitex (Berlin) in verschiedenen Maßstäben benutzt. Die Durchführung erfolgte hierbei laut Herstellerangaben.

2.4.4 Isolation genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus Blattmaterial adulter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Zwei bis drei kleine Blätter wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in 1 ml Extraktionspuffer [100 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 50 mM EDTA; 1,5% (v v⁻¹) SDS; 10 mM β -Mercaptoethanol; pH 8] aufgenommen. Nach kurzem und kräftigem Mischen wurde der Ansatz 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend 300 μ l 5 M Kaliumacetat (pH 4,8) zugegeben. Die Proben ruhten bis zu einer Stunde auf Eis und wurden danach zentrifugiert (23.000 \times g, 10 min).

Die Nukleinsäuren wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Zentrifugation (14.000 \times g, 5 min) von Proteinen und restlichen Zellbestandteilen getrennt. Die Fällung der DNA in der wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (23.000 \times g, 5 min) wurde das Pellet mit 70% (v v⁻¹) Ethanol gewaschen und in 50 μ l Puffer [10 mM Tris/HCl, pH 8,5] gelöst. Durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm erfolgte die Quantifizierung der DNA.

2.4.5 DNA-Präzipitation

Zur Aufkonzentrierung der DNA wurde diese mit 1×10^{-1} Vol. Na-Acetat (3 M, pH 6,5) versetzt und anschließend mit 2,5 Vol. Ethanol auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation (23.000 \times g, 15 min) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in Puffer [10 mM Tris/HCl, pH 8,5] gelöst.

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der DNA wurde in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400 und 9700; Perkin Elmer) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Das Ansatzvolumen variierte je nach Verwendung zwischen 20 und 50 μ l. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten können Tabelle 2-4 entnommen werden.

Tabelle 2-4 PCR Komponenten

Komponente	10 \times Puffer	dNTP Mix	Wasser	Oligo-nukleotid	Taq-Polymerase	Template DNA
Endkonzentration	1 \times	200 μ M	Additiv Gesamt-Vol.	10-20 pmol	1-2 Units	100 ng DNA

Ein typisches Temperaturprogramm einer Polymerase-Kettenreaktion besteht aus i) einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für fünf Minuten, ii) Denaturierung für 30 Sekunden, iii) dem *Annealing*-schritt, iv) einem Elongationsschritt bei 72°C und v) der finalen Elongation für 7-10 min. Die Schritte ii) bis iv) wurden zu Zyklen zusammengefasst und 25 bis 35mal wiederholt.

Die Generierung geeigneter Oligonukleotid-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Vector NTI (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG (Ebersberg, Deutschland).

Für Oligonukleotid-Kombinationen mit hohen T_M -Wert-Differenzen wurde die *Touchdown*-PCR verwendet. Hierbei wird die *Annealing*-temperatur in den ersten zehn Zyklen in Schritten von je einem Kelvin verringert. Die Sequenzen und der T_M -Wert der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt. Die Elongationszeit wurde ausgehend von der theoretischen Syntheserate von 1000 (Taq-Polymerase; Sigma und Fermentas) bzw. 500 bp min⁻¹ (Pfu-Polymerase; Sigma und Fermentas) berechnet.

2.4.7 *Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen*

Die Restriktionsverdaue von 1-5 µg DNA wurden mit je 10 *Units* Restriktions-Endonuklease (Fermentas) in 1× Reaktionspuffer ein bis drei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend thermisch inaktiviert. Doppelverdaue wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Restriktionsverdaue im Rahmen der *Southern*-Analyse wurden 10 bis 20 µg genomische DNA mit 1× Reaktionspuffer und je 20 *Units* Enzym (Fermentas) bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.4.8 *Agarose-Gelelektrophorese*

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Gelmatrix besteht je nach Trennbereich aus 1 bis 2% (w v⁻¹) Agarose in 1× TAE-Puffer [40 mM Tris/Acetat; 2 mM EDTA]. Proben werden in 1× Ladepuffer [2% (w v⁻¹) Ficoll; 10 mM EDTA, pH 8; 0,1% (w v⁻¹) SDS; 0,025% (w v⁻¹) Bromphenolblau] aufgenommen und bei einer Spannung von 1 bis 10 V cm⁻¹ Gel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht wurde der Gelmatrix Ethidiumbromid (0,5 µg ml⁻¹) zugesetzt. Als Größenstandard wurde der Marker *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas) mitgeführt.

2.4.9 DNA-Gelextraktion

Die Extraktion und Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) laut Herstellerangaben.

2.4.10 Southern-Analyse (Southern 1975)

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene genomische DNA wurde auf einem 1%igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA im Gel 30 min mit 0,25 M HCl depuriniert und anschließend in 0,5 M NaOH zweimal für 20 min denaturiert. Nach einer zweimal zwanzigminütigen Inkubation in Neutralisierungslösung [1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7] erfolgte Transfer mit 20× SSC [3 M NaCl; 0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat] auf eine positiv geladene Nylonmembran (Porablot NY plus). Die DNA wurde durch Backen (80°C, 30 min) und UV-Bestrahlung im Auto-Crosslink-Modus (UV Stratalinker™ 1.800; Agilent Technologies) kovalent an die Membran gebunden.

2.4.11 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Das DNA-Sondentemplate wurde entweder mit Restriktions-Endonukleasen aus einem entsprechenden Vektor ausgeschnitten oder das Fragment mittels PCR amplifiziert und schließlich durch Gelextraktion aufgereinigt. Die Markierung erfolgte mit dem *MegaPrime™ DNA Labelling Kit* (GE Healthcare) laut Herstellerangaben. Dabei wurden 21 µl DNA mit 5 µl *Random* Oligonukleotide für 5 min bei 95°C denaturiert. Auf Eis wurden je 4 µl dNTPs, 5 µl Reaktionspuffer, 5 µl [α -³²P]-dATP und zwei *Units* Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Um nicht gebundene dNTPs zu entfernen wurde der Ansatz mit einer *Probe Quant™* G-50 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) gereinigt. Nach einer finalen Denaturierung bei 95°C wurde die Sonde zum Hybridisierungspuffer (siehe 2.4.12) gegeben.

2.4.12 Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit Hybridisierungspuffer [0,9 M NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; 5 mM EDTA; 0,1% (w v⁻¹) SDS; 0,1% (w v⁻¹) Ficoll; 0,1% (w v⁻¹) PVP; 0,1% (w v⁻¹) BSA; 50% (v v⁻¹) Formamid; >100 µg ml⁻¹ Herings-Sperma DNA] in einem Hybridisierungsgefäß eine Stunde bei 42°C prähybridisiert. Die Hybridisierung der immobilisierten DNA mit der ³²P-markierten Sonde erfolgte über Nacht in Hybridisierungspuffer. Die Membran wurde

anschließend dreimal mit $3\times$ SSC/0,1% ($v v^{-1}$) SDS (15 min, 60°C) gewaschen und mit einem *Phosphor-imaging*-System analysiert (Phosphor *Imager*TM Typhoon 9410, GE Healthcare).

2.4.13 Isolation DNA-freier RNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe der TRIZOL[®] Methode aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana*. Dazu wurden einige junge Blätter in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml TRIZOL[®]-Lösung [0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat; 5% ($v v^{-1}$) Glycerin; 38% ($v v^{-1}$) Phenol] aufgenommen. Nach kurzem kräftigen Mischen und weiteren zehn Minuten Schütteln wurden 0,2 ml Chloroform zugefügt. Die Proben wurden gut gemischt, kurz bei RT inkubiert und danach bei 12.000 $\times g$ und 4°C abzentrifugiert.

Die RNA in der wässrigen Phase wurde mit 0,3 ml Hochsalzpuffer [0,8 M Natriumcitrat; 1,2 M NaCl] und 0,3 ml Isopropanol jeweils zehn Minuten bei RT und 4°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 75% ($v v^{-1}$) Ethanol gewaschen und in DEPC-Wasser gelöst. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Um DNA-Verunreinigungen zu beseitigen, wurden die Proben mit Desoxyribonuklease I (Fermentas) laut Herstellerangaben behandelt.

2.4.14 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese aus RNA-Templates wurde entweder mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) oder der Superscript III (Invitrogen) laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinpräparation aus Bakterien

Die pelletierten Bakterien (16 g *E.coli*) wurden bei 4°C in 160 ml Lyse-Puffer [50 mM PO₄-Puffer; 100 mM NaCl; 10% ($v v^{-1}$) Glycerin; 25 mM Imidazol; 1% ($v v^{-1}$) Triton X-100; 25 mM Imidazol; pH 8] resuspendiert und mittels *French Press* dreimal nacheinander aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 0,1% ($v v^{-1}$) Polyethylenimin wurde der Zellextrakt bei 4°C und 15000 $\times g$ für 30 min zentrifugiert. Der klare Proteinextrakt wurde anschließend bei -20°C tiefgefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.5.2 Proteinpräparation aus Pflanzen

Die Proteinproben wurden in jedem Fall bei 4°C und mit Handschuhen präpariert, um die Kontamination der Proben mit Keratinen zu verringern. Zur Aufreinigung von Proteinkinasen wurde Blattmaterial gemörsert und entweder mit 1-2 Vol. Kinase-Extraktionspuffer [25 mM Tris/HCl; 75 mM NaCl; 15 mM EGTA; 15 mM Glycerophosphat; 15 mM 4-Nitrophenylphosphat; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM NaF; 0,5 mM Na₃VO₄; 0,5 mM PMSF; 10 µg ml⁻¹ Leupeptin; 10 µg ml⁻¹ Aprotinin; 0,1% (v v⁻¹) Tween[®] 20; pH 7,8], TAP-Extraktionspuffer [6 mM Na₂HPO₄; 4 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1% (v v⁻¹) Nonidet P-40; 10% (v v⁻¹) Glycerin; 1 mM NaF; 0,1 mM Na₃VO₄; 4 µg ml⁻¹ Leupeptin; 1× Roche Protease Inhibitor Mix EDTA-*free*; pH 7,0] oder strep-Extraktionspuffer [100 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 10% (v v⁻¹) Glycerin; 10 mM DTT; 5 µg ml⁻¹ Aprotinin; 5 µg ml⁻¹ Leupeptin; 1× Roche Inhibitor Mix; 0,5% (v v⁻¹) Triton X-100; pH 8] und einem Homogenisator (Heidolph RZR 2020) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde nach einer Zentrifugation (4.500 ×g, 5 min; 160.000 ×g, 10 min bei 4°C) filtriert (Miracloth, Calbiochem) und direkt weiterbearbeitet.

2.5.3 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung von Proteinen in größeren Volumina erfolgte mit dem *Bradford Protein Assay*. Dazu wurden je 10 µl verschiedener Verdünnungsstufen von Proteinextrakten mit 200 µl 1:5 verdünntem Bradford-Reagenz (Biorad) vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Messung der Absorption bei 595 nm. Über eine definierte BSA-Eichreihe konnte die Proteinkonzentration rechnerisch ermittelt werden.

Die Quantifizierung von Proteinen in sehr kleinen Volumina erfolgte mit dem EZQ™ *Protein Quantitation Kit* (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

2.5.4 Denaturierende und native Proteinpräzipitation sowie Entsalzung

Für die Präzipitation sehr niedrig konzentrierter Proteine wurde eine TCA-DOC-Fällung durchgeführt. Die Proteinlösung wurde mit 0,02% (w v⁻¹) Natriumdeoxycholat (DOC) versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit 10% (v v⁻¹) Trichloressigsäure (TCA) eine Stunde bei 4°C gefällt. Nach einer Zentrifugation (23.000 ×g, 20 min, 4°C) wurde das Pellet zweimal mit -20°C kaltem Aceton gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde entweder in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2% (w v⁻¹)

SDS; 10% (v v⁻¹) Glycerin] oder in Trypsin Verdauungs-Puffer (50 mM NH₄HCO₃, 0,1% (w v⁻¹) RapiGest SF (Waters) aufgenommen.

Die Verwendung des *StrataClean*TM Resin (Agilent Technologies) stellt eine weitere Methode zur Aufkonzentrierung von Proteinen dar (Ziegler *et al.* 1997). Hierbei wird 1 ml Proteinlösung mit 10 µl Resin versetzt und gut durchmischt. Nach einer kurzen Zentrifugation (300 ×g) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 µl 2× SDS-Probenpuffer (siehe 2.5.10) aufgenommen.

Zur nativen Präzipitation von Proteinkomplexen wurden Polyethylenglykol (PEG) und Ammoniumsulfat verwendet. Die Proteinextrakte wurden entweder durch langsame Zugabe von 50%iger PEG 4000 Lösung oder einer 100%igen Ammoniumsulfat-Lösung bei 4°C gefällt. Die Präzipitation äquilibrierte für 30 min auf Eis und zentrifugierte anschließend zwanzig Minuten bei 4.500 ×g. Das Pellet wurde gegebenenfalls in Extraktionspuffer resolubilisiert.

Zur Entsalzung beziehungsweise zum Umpuffern von Proteinlösungen wurden PD10-*Columns* (GE Healthcare) laut Herstellerangaben verwendet.

2.5.5 Chemische Vernetzung von Proteinen (*crosslinker*)

Zur chemischen Quervernetzung der TAP-getagten MAPK wurden die chemischen Quervernetzer BS³, DTSSP und DPDPB (Pierce) eingesetzt. Die beiden ersteren vernetzen Lysin-Seitenketten (Lys-Reste), der Vernetzer DPDPB bildet Disulfid-Brücken mit frei zugänglichen Cystein-Seitenketten aus, die unter reduzierenden Bedingungen gespalten werden können. Für alle Vernetzer wurden die optimalen Reaktionsbedingungen und Konzentrationsverhältnisse ermittelt und angewendet (BS³: 1-10 mM, 30 min, 25°C; DTSSP: 1-10 mM, 30 min, 25°C; DPDPB: 1-7 mM, 30 min, 27°C). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.5.6 Ausschlusschromatographie

Die Ausschlusschromatographie wurde an einem ÄKTA Explorer FPLC-System (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde ein Verbundmaterial aus vernetzter, kovalent an Dextran gebundener Agarose verwendet (Säule *HiLoad* 16/60 Superdex 200 *prep grade*, GE Healthcare). Damit konnte eine Auftrennung globulärer Proteine im Bereich von 10 bis 600 kDa erzielt werden. Die Säule wurde mit dem *Molecular Weight Marker Kit* für Gelfiltrations-Chromatografie von Sigma (Steinheim, Deutschland) nach Herstellerangaben kalibriert.

Nach einer Äquilibrierung des Säulenmaterials mit 2 Vol. Laufpuffer [6 mM Na₂HPO₄; 4 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10% (v v⁻¹) Glycerin; pH 7,0] bei 1 ml min⁻¹ Flussgeschwindigkeit wurde über eine Injektionsschleife automatisch 1 ml Probe (4-5 mg ml⁻¹) appliziert. Die chromatografische Trennung der Proteine wurde anhand der kontinuierlichen Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Nach dem Durchfluss des Ausschlussvolumens erfolgte eine Fraktionierung (1,5 ml Fraktionen) mit Hilfe des Fraktionssammlers Frac-950 (GE Healthcare).

2.5.7 *Aufreinigen eines Proteins mit einem His-Epitoptag*

Die Reinigung von His-Epitop markierten Proteinen erfolgte über die Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden). Der klare Proteinextrakt wurde dazu über Nacht bei 4°C auf einem Drehschüttelapparat (Rettberg, Göttingen) mit der Ni-NTA Agarose inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA Agarose zweimal im Batch-Verfahren mit 7 Volumen Lyse-Puffer [50 mM PO₄-Puffer; 100 mM NaCl; 10% (v v⁻¹) Glycerin; 25 mM Imidazol; 1% (v v⁻¹) Triton X-100; pH 8] gewaschen. Die Elution erfolgte anschließend mit einem Volumen Lyse-Puffer mit 350 mM Imidazol. Die Proteine wurden anschließend aufkonzentriert und ggf. umgepuffert.

2.5.8 *Aufreinigung eines Proteins mit einem Tandem Affinity Purification Tag (Puig et al. 2001)*

Das Pflanzenmaterial (15 g) bzw. Zellkulturmaterial (8 g) wurde mit TAP-Extraktionspuffer extrahiert und gegebenenfalls mit 40% (v v⁻¹) Ammoniumsulfat präzipitiert. Zur Bindung der Proteine an IgG-Sephrose wurde der Proteinextrakt mit 250 µl IgG Sepharose (IgG Sepharose™ 6 *Fast Flow*, GE Healthcare; gewaschen mit IPP150 Puffer) versetzt und zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden die IgG-Beads in 4ml-Chromatographie-Säulen (Poly-Prep® Chromatographie Columns, BioRad) mit 25 ml IPP150 [10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,1% (v v⁻¹) Nonidet P-40; 10% (v v⁻¹) Glycerin; pH 8] und 10 ml TEV *Cleavage Buffer* [10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,1% (v v⁻¹) Nonidet P-40; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% (v v⁻¹) Glycerin; pH 8] gewaschen. Die IgG-Sephrose wurde in 1 ml TEV *Cleavage Buffer*, 1 mM PMSF resuspendiert und mit 100 *Units* TEV-Protease eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert.

Das Sepharose-Eluat wurde mit 3 Vol. Calmodulin *Binding Buffer* [10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 10 mM β-Mercaptoethanol; 10%

(v v⁻¹) Glycerin; pH 8], 3 µl ml⁻¹_{Eluat} CaCl₂ (1 M) und 200 µl Calmodulin *Affinity Resin* (Agilent Technologies) versetzt und rotierte ein bis zwei Stunden bei 4°C. Anschließend wurde 2× mit 10 ml Calmodulin *Rinsing Buffer* [50 mM Ammoniumhydrogencarbonat; 75 mM NaCl; 1 mM Mg-Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 0,1% (v v⁻¹) Nonidet P-40; pH 8] und 1× mit 10 ml Calmodulin *Rinsing Buffer* mit 0,02% (v v⁻¹) Nonidet P-40 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Calmodulin *Elution Buffer* [50 mM Ammoniumhydrogencarbonat; 25 mM EGTA; pH 8] auf Eis.

In einigen Fällen wurde die Tandemaffinitäts-Proteinreinigung bereits nach der ersten Affinitäts-Chromatographie gestoppt. Hierbei erfolgte eine fraktionierte Elution der IgG Sepharose unter azidischen Bedingungen (100 mM Glycin, pH 3). Die Fraktionen wurden umgehend mittels Tris/HCl (1 M, pH 9) neutralisiert.

2.5.9 *Aufreinigung eines Proteins mit einem strep Epitop-Tag (Witte et al. 2004)*

Das Pflanzenmaterial wurde mit ein bis zwei Volumen strep-Extraktionspuffer extrahiert und gegebenenfalls mit 20% (v v⁻¹) PEG 4000 präzipitiert. Der die MPK6-strep enthaltende Überstand wurde vier Stunden gegen den Extraktionspuffer ohne Inhibitoren dialysiert und 100 µg ml⁻¹ Avidin zugegeben. Die Proteine wurden 30 min rotierend mit 10 µl *MacroPrep Beads* oder 200 µl Strep-Tactin Resin (IBA BioTAGnologies, Göttingen) bei 4°C inkubiert. Danach wurden die strep-Matrix mit drei Volumen strep-Waschpuffer [50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,05% (v v⁻¹) Triton X-100; pH 8,0] gewaschen. Die Elution erfolgte entweder mit dreimal einem Volumen Elutionspuffer [100 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM Desthiobiotin; pH 8,0] bei 16°C oder durch Aufkochen in zweifachem SDS-Probenpuffer.

2.5.10 *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl; 10% (v v⁻¹) Glycerin; 2% (w v⁻¹) SDS; 1% (v v⁻¹) β-Mercaptoethanol; 0,1% (w v⁻¹) Bromphenolblau; pH 6,8] aufgenommen und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970). Die Proben wurden im Sammelgel [125 mM Tris/HCl; 5% (v v⁻¹) Acrylamid; 0,1% (w v⁻¹) SDS; 0,1% (w v⁻¹) APS; 0,1% (v v⁻¹) TEMED; pH 8,8] bei 15 mA konzentriert und im Trenngel [375 mM Tris/HCl; 8-15% (v v⁻¹) Acrylamid; 0,1% (w v⁻¹) SDS; 0,1% (w v⁻¹) APS; 0,04% (v v⁻¹) TEMED; pH 8,8] bei 30 mA elektrophoretisch aufgetrennt [Laufpuffer: 25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% (w v⁻¹) SDS]. Je nach Proteingröße wurden verschiedene Acryl-

amid-Konzentrationen im Trenngel gewählt (15% Acrylamid für Proteine im Bereich 5-60 kDa; 10% Acrylamid für Proteine im Bereich 30-120 kDa).

2.5.11 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die native Auftrennung von Proteinen erfolgte entsprechend der SDS-PAGE unter Ausschluss von Detergenzien und reduzierenden Reagenzien auf Gradientengelen von 5 bis 15%. Zur Erhöhung der Löslichkeit der Proteine in der Gelmatrix wurde zusätzlich ϵ -Aminocaprinsäure ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$) zugesetzt.

2.5.12 Immuno-Detektion

Die mittels PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$; Porablot) mit Blottingpuffer [24 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,037% (w v^{-1}) SDS; 20% (v v^{-1}) Methanol] im *semi-dry* Verfahren transferiert. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$ für ein bis zwei Stunden.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu reduzieren, wurde die Membran eine Stunde in TBST [20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% (v v^{-1}) Tween[®] 20; pH 7,5] mit 5% (w v^{-1}) Magermilchpulver blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4°C unter den in Tabelle 2-6 aufgeführten Bedingungen. Nach dem Waschen der Membran ($1 \times 15 \text{ min}$, $3 \times 5 \text{ min}$ in TBST) wurde der entsprechende sekundäre Antikörper eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Die Waschschritte wurden anschließend wiederholt.

Tabelle 2-5 Bedingungen für primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Referenz</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Pufferlösung</i>
Anti-MPK6	R.Schlichting	1:5000	TBST 5% Milchpulver
Anti-MPK3	R.Schlichting	1:1000	TBST 5% Milchpulver
Anti-MPK4	Sigma	1:1000	TBST 5% Milchpulver
Anti-TpEYp	Cell Signaling	1:1000	0,1x TBST 3% BSA
Anti-TGA2	C.Gatz, Göttingen	1:1000	TBST 5% Milchpulver
Anti-PAP	Sigma	1:1000	TBST 5% Milchpulver
Anti-c-myc	Sigma	1:5000	TBST 5% Milchpulver
Anti-HA	Eurogentec	1:1000	TBST 5% Milchpulver

Als sekundärer Antikörper wurde in allen Fällen ein Meerrettich-Peroxidase-Konjugat verwendet. Die Membran wurde fünf Minuten mit ECL-Lösung (ECL Plus *Western Blotting Detection Reagents*, GE Healthcare) inkubiert. Die Belichtung des Films (Kodak[®] BioMax MS

Film, Sigma-Aldrich) erfolgt durch Emissionen von Photonen. Die Filme wurden mittels COMPACT 2 X-Ray Film Prozessor (PROTEC Medizintechnik) entwickelt.

2.5.13 Visualisierung von Proteinen in PA-Gelen

Die Coomassie-Färbung erlaubt die Visualisierung von Proteinmengen ab 400 ng pro Bande. Nach der Fixierung des Proteingels [40% (v v⁻¹) Ethanol, 10% (v v⁻¹) Essigsäure] für eine Stunde erfolgte die Färbung mit Coomassie Lösung [40% (v v⁻¹) Ethanol, 10% (v v⁻¹) Essigsäure, 2 g l⁻¹ Coomassie *Blue* R-250] für 30 min. Danach wurde das Gel mehrmals mit 10%iger Essigsäure gewaschen um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

Mit der empfindlicheren Silberfärbung können sehr kleine Proteinmengen (2-10 ng pro Bande) sichtbar gemacht werden. Die Färbung erfolgte nach Blum, Beier und Gross (1987). Das Gel wurde dazu zunächst in 40% (v v⁻¹) Ethanol, 10% (v v⁻¹) Essigsäure für zwei Stunden oder über Nacht fixiert. Dann erfolgten zwei Waschschriffe mit 30% (v v⁻¹) Ethanol (je 20 min) und Wasser (20 min) um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Nach einer Minute Vorbehandlung in einer 0,02%igen Na₂S₂O₃-Lösung wurde das Gel dreimal kurz mit Wasser gewaschen. Über einen Zeitraum von maximal 20 min wurde das Gel in 0,1%iger AgNO₃-Lösung inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit Wasser erfolgte die Färbung in Entwicklerlösung [0,05% (v v⁻¹) Formaldehyd; 3% (w v⁻¹) Na₂CO₃; 0,04% (w v⁻¹) Na₂S₂O₃]. Die Farbreaktion wurde mit 7% (v v⁻¹) Essigsäure gestoppt. Die Gele wurden anschließend mit Wasser gewaschen, konserviert [25% (v v⁻¹) Ethanol; 3% (v v⁻¹) Glycerin] und getrocknet.

2.5.14 Entfärben von Proteinen in Gelmatrizen und tryptischer Verdau

Die Entfärbung der ausgeschnittenen Gelbanden und der tryptische In-Gel-Verdau erfolgten laut Herstellerangaben (Roche). Für einen Verdau in Lösung wurden TCA-präzipitierte Proteine in 50 mM Ammoniumbicarbonat mit 0,1% (w v⁻¹) *Rapigest* (Waters) gelöst. Das Detergenz wurde nach der proteolytischen Spaltung in azidischem Milieu nach Herstellerprotokoll ausgefällt und abzentrifugiert.

In allen Fällen wurde rekombinantes Trypsin (*proteomics grade*, Roche) in einem Verhältnis Protease zu Protein von 1:50 eingesetzt. Anschließend wurden die Peptide mit 50% (v v⁻¹) Acetonitril und 0,1% (v v⁻¹) TFA aus den Gelstückchen extrahiert beziehungsweise in 0,1% (v v⁻¹) TFA aufgenommen.

2.5.15 Flüssig-Chromatographie Elektrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie (1D-nano-LC-ESI-IT-MS/MS)

Die Peptide wurden zunächst mit einem Gradienten von 2-40% (v v⁻¹) Laufmittel B [ACN / 0,1% (v v⁻¹) FA] über 30 oder 120 min auf einer 1D-nano-Flüssig-Chromatographie (nano-LC) aufgetrennt (15 cm PepMap C18-Säule, Flussrate 240 nl min⁻¹, mobile Phase Laufmittel A [H₂O / 0,1% (v v⁻¹) FA] und Laufmittel B) und anschließend in einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonic HCT Ultra PTM Discovery System) analysiert. Als Nanosprayquelle kam sowohl die Originalquelle des MS-Herstellers zum Einsatz (SilicaTip-Emitter, New Objective) als auch eine Chip-basierte Quelle der Firma Advion (Triversa NanoMate). Peptidionen wurden in einem Massenbereich von 400-1400 m z⁻¹ für eine CID- (*Collision Induced Dissociation*) Fragmentierung ausgewählt. Die Prozessierung der aufgenommenen MS/MS-Spektren erfolgte mit dem Programm *DataAnalysis*TM (Version 4.0, Bruker Daltonic).

2.5.16 Datenbanksuche und Auswertung

Zur Analyse der massenspektrometrischen Daten wurde die Suchmaschine MASCOT (Version 2.2 Matrix Science, London, UK) eingesetzt. Die Protein-Identifizierungen erfolgten über den Vergleich der experimentell erhaltenen MS/MS-Spektren mit den von *in silico* verdauten Proteinen einer Protein-Datenbank abgeleiteten theoretischen MS/MS-Spektren. Dazu wurde die *in-house* verfügbare Suchmaschine mit den in Tabelle 2-6 aufgezählten Parametern genutzt.

Tabelle 2-6 Parameter für die MASCOT Datenbanksuche

<i>Parameter</i>	<i>Einstellung</i>
Datenbank	ATH_PROT basierend auf TAIR8 ATH_PROT_TAP basierend auf TAIR7 und ergänzt durch MAPK-TAP Proteinsequenzen
Taxonomie	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Enzym	Trypsin
Max. Anzahl der ausgelassenen Spaltstellen	2
variable Modifikationen	Methionin-Oxidation
MS- und MS/MS-Toleranz	±0,5 Da
Peptid-Ladung	+2 und +3
Peak	monoisotopisch
Instrument	ESI-IT

Zur statistischen Auswertung und vergleichenden Darstellung der Ergebnisse wurden die durch MASCOT identifizierte Proteine mit dem Programm Scaffold (Proteome-Software, Version 2_04_00) analysiert. Dieses Programm nutzt neben der Protein-Identifizierung über die MASCOT-Datenbank zusätzlich den X!Tandem Algorithmus (www.thegpm.org; Version 2007.01.01.1). Bei der MS/MS-Datenanalyse wurden nur Peptide akzeptiert, die nach Berechnung des *Peptide Prophet* Algorithmus (Keller *et al.* 2002) eine Wahrscheinlichkeit von über 95% aufzeigten. Weiterhin wurden Proteine als identifiziert eingestuft, wenn sie eine Wahrscheinlichkeit von über 99% aufwiesen und mindestens zwei Peptide zugeordnet wurden. Die Protein-Wahrscheinlichkeiten wurden ebenfalls durch den *Protein Prophet* Algorithmus (Nesvizhskii *et al.* 2003) zugewiesen. Proteine, denen ähnliche Peptide zugeordnet wurden und die nicht basierend auf der MS/MS-Analyse differenziert werden konnten, wurden gruppiert.

2.6 *BiFC und Mikroskopie*

Die Analysen der *in vivo* Interaktionen zwischen den MAPKs und dem jeweiligen putativen Interaktor erfolgten mit der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC, Brachard *et al.* 2004; Walter *et al.* 2004). Dazu wurden ausgewählte Kandidaten-Gene mit dem N- bzw. C-terminalen Teil des YFP (155 bzw. 86 Aminosäuren) fusioniert und in *Arabidopsis thaliana* Mesophyll-Protoplasten transfiziert.

Die mikroskopischen Analysen wurden mit einem Axioplan2-imaging Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte über die Software AxioVision 4.2. Das Gerät war ausgestattet mit dem Filtersatz 46 (Anregungsfilter: 500-520 nm, Strahlenteiler: 515 nm, Emissionsfilter: 535-565 nm) zur Detektion der YFP-Fluoreszenz und dem Filtersatz 47 (Anregungsfilter: 436-456 nm, Strahlenteiler: 455 nm, Emissionsfilter: 480-520 nm) zur Detektion der CFP-Fluoreszenz. Die präparierten Protoplasten wurden sowohl mit Durchlicht/Hellfeld- als auch unter Fluoreszenz-Bedingungen bei verschiedenen Vergrößerungen (10fach und 40fach) analysiert. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer AxioCam MRc5 Kamera.

2.6.1 *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung der BiFC-Daten erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*). Mit Hilfe dieses Verfahrens können die Unterschiede zwischen eingeteilten Gruppen auf Signifikanz analysiert werden. Dabei wird getestet, ob die Varianz zwischen den

Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb einer Gruppe. Die ANOVA wurde mit dem Programm StatGraphics (Version 2.0) durchgeführt.

Voraussetzung einer Varianzanalyse ist die Normalverteilung der Messwerte, die im Vorfeld ebenfalls mit dem Programm StatGraphics (Version 2.0) getestet wurde. Mit Hilfe der ANOVA werden dann zwei Hypothesen formuliert, eine Null- und eine Alternativhypothese. Die Nullhypothese entspricht hier dem Fall, dass zwei putative Protein-Interaktionspartner keinen Einfluss auf den Prozentsatz der YFP-fluoreszierenden Protoplasten haben und somit der gleichen Gruppe zugeordnet werden können. Die Alternativ-Hypothese sagt aus, dass die Kombination zweier Interaktionspartner einen Einfluss auf den Prozentsatz der YFP-fluoreszierenden Protoplasten haben und somit unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden müssen.

Wenn sich Gruppen signifikant unterscheiden, kann angenommen werden, dass in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten wirken. So können im Vergleich mit der Positiv- und Negativkontrolle Rückschlüsse auf eine bestehende oder nicht erfolgte Protein-Interaktion zwischen den Fusionsproteinen gezogen werden.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten höhermolekulare Strukturen mit MAPK Beteiligung aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und einzelne MAPK assoziierte Proteine anschließend identifiziert und validiert werden. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Tandem- und StrepII-Affinitätschromatographie der drei flg22-responsiven MAPK MPK3, MPK4 und MPK6, für die verschiedene stabile Zellkultur- und Pflanzen-Transformanten charakterisiert wurden.

3.1 Herstellung und Charakterisierung stabiler Transformanten

3.1.1 Charakterisierung von Zellsuspensionskulturen

Die Verwendung von Zellsuspensionskulturen als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie bietet einige Vorteile. Gegenüber Pflanzen sind die Anzuchtbedingungen einfacher, der geringe Platzanspruch ermöglicht eine schnelle und effiziente Generierung großer Mengen Biomasse. Auch die Handhabung des Erntevorgangs sowie die Applikation von Elizitoren können schnell und einfach erfolgen. *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionskulturen konnten bereits erfolgreich als Ausgangsmaterial zur Analyse des Zellzyklus-Interaktoms genutzt werden (Van Leene *et al.* 2007). Dabei wurden durch die Tandemaffinitäts-Chromatographie von TAP-markierten Cyclin-abhängigen Kinasen 28 neue molekulare Assoziationen und 14 bereits bekannte Interaktionen isoliert und identifiziert.

In dieser Arbeit standen die Ler-0 Zellsuspensionskulturen MPK3::MPK3-TAP, 35S::MPK3-TAP, 35S::TAP zur Verfügung (R. Schlichting, unveröffentlicht). Der TAP-Tag wurde in allen Fällen C-terminal an das Zielprotein angefügt. Die Vektorkontrolle 35S::TAP stellt eine Überexpression des 20 kDa großen TAP-Tags unter dem starken 35S-Promotor dar. Mit ihrer Hilfe sollten abundante und unspezifisch bindende Proteine nach der Affinitätschromatographie als falsch-positive ausgeschlossen werden können. MPK3::MPK3-TAP Pflanzen exprimierten das Protein MPK3-TAP dem natürlichen Level entsprechend. In 35S::MPK3-TAP Pflanzen wurde es mit Hilfe des starken 35S-Promotor überexprimiert.

Die Zellkulturen waren aufgrund der nicht vorhandenen entsprechenden *Knock-Out* Zellkulturen im Wildtyp Ler-0 Hintergrund generiert worden. Der Versuch einer Transfektion der Ler-0 Zellkultur mit dem MPK6-TAP Konstrukt ergab leider keine positiven Transformanten (Daten nicht gezeigt).

Nach der PCR-basierten Selektion der MPK3-TAP Zellsuspensionskulturen (R. Schlichting) wurden Analysen zur Proteinexpression angeschlossen. In den putativen MPK3-TAP Transformanten konnte sowohl das Protein MPK3 als auch MPK3-TAP detektiert werden

(Abbildung 3-1A), wohingegen in der Vektorkontrolle 35S::TAP nur die MPK3 detektiert wurde. Weiterhin zeigte sich eine Bande bei 55 kDa, deren Identität unklar war. Sowohl mit einem Antiserum gegen die Protein A-Domäne des C-terminalen TAP-Tag (anti-PAP) als auch mit dem MPK3-Antiserum, das ein Peptid-Antikörper gegen den N-Terminus der MPK3 darstellt, konnte diese ungeklärte Bande detektiert werden (Abbildung 3-1A).

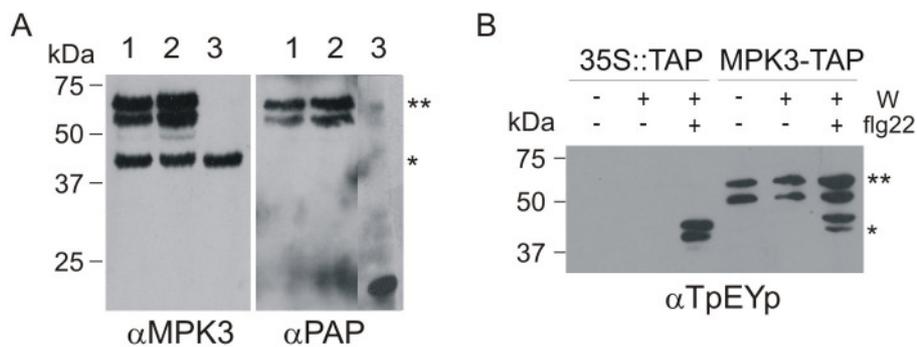


Abbildung 3-1 Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen (1)

Die Zellsuspensionskulturen MPK3::MPK3-TAP (1) und 35S::MPK3-TAP (2) sowie die Vektorkontrolle 35S::TAP (3) wurden mit Hilfe eines Büchner-Trichters geerntet, die entsprechend ausgewiesenen Proben zwei Stunden in frischem Medium gewaschen (W) und teilweise anschließend 10 min mit 10 nM Flagellin-Peptid eliziert (flg22). Nach der Elizitierung wurden Immuno-Blot Analysen mit Antiseren durchgeführt, die entweder die Protein A-Domäne des TAP-Tag (α PAP), die MPK3 (α MPK3) oder spezifisch das phosphorylierte TEY-Motiv (α TpEYp) der MAPK erkannten. Die Sterne markieren das MPK3-TAP Protein bei 63 kDa (**), und die MPK3 bei 43 kDa (*).

Zusätzlich erschien diese Bande auch bei der TpEYp-Immunodetektion (Abbildung 3-1B). Das TpEYp-Antiserum kann spezifisch das nach flg22-Elizitierung phosphoryliert vorliegende TEY-Motiv der in Arabidopsis vorkommenden MAPK erkennen. Hier zeigte sich nun, dass das MPK3-TAP Protein sowohl im nicht-induzierten Zustand als auch nach einer Elizitierung (100 nM flg22-Peptid) phosphoryliert vorliegt. Dagegen konnten in der Kontroll-Zellkultur 35S::TAP die phosphorylierten MPK3 und MPK6 erst nach der Elizitierung mit dem TpEYp-Antiserum detektiert werden (Abbildung 3-1B).

Eine Analyse mittels Gelpermeations-Chromatographie ergab, dass das unbekannte 55 kDa Protein zusätzlich in Fraktionen mit höherem Molekulargewicht auftrat, wohingegen die MPK3-TAP ebenso wie die MPK3 nur im monomeren Bereich (63 kDa bzw. 43 kDa) detektiert werden konnte (Abbildung 3-2).

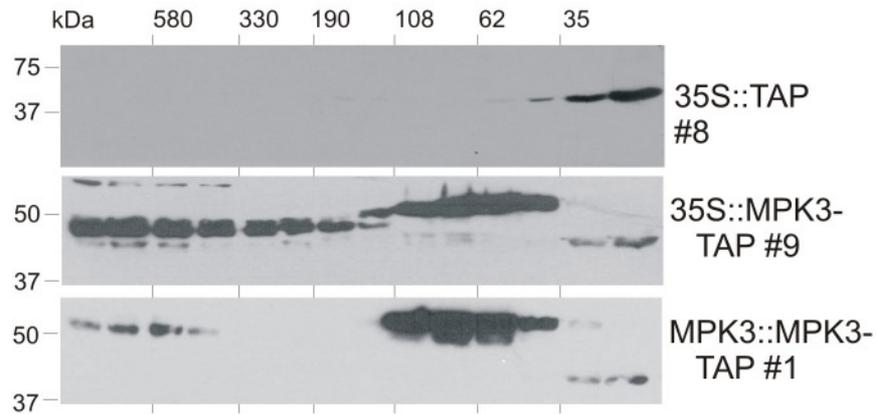


Abbildung 3-2 Charakterisierung der Zellsuspensionskulturen (2)

Gelpermeations-Chromatographie mit Proteinextrakten nicht behandelter und flg22-elizierter Zellsuspensionskulturen. Die löslichen Proteine (4 mg Gesamtprotein) wurden mittels FPLC auf einer Gelfiltrationssäule (*HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade*, GE Healthcare) bei einem Fluss von 1 ml min^{-1} aufgetrennt (30 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% Glycerin, pH 7). Die Proteine jeder zweiten Fraktion wurden mit TCA präzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem MPK3-Antiserum analysiert (Ler-0 MPK3: 43 kDa, MPK3-TAP: 63 kDa).

Die Analyse der Tandemaffinitäts-Proteinreinigung erfolgte sukzessive über die elektrophoretische Auftrennung einzelner Teilschritte mit anschließender Immuno-Detektion bzw. Silberfärbung der Gele (Abbildung 3-3). Das MPK3-TAP Protein wurde sowohl im Ausgangsextrakt als auch im Eluat detektiert, was auf eine erfolgreiche Proteinreinigung schließen ließ. Das MG des Proteins verkleinerte sich dabei nach der ersten Affinitätschromatographie von 63 auf 48 kDa aufgrund der zur Elution notwendigen Abspaltung eines Teils des TAP-Tag. Jedoch war das 55 kDa Protein ebenfalls im Eluat detektierbar. Dabei blieb das MG von 55 kDa unverändert, das Protein wurde nicht von der TEV Protease prozessiert. Es könnte aufgrund seiner Abundanz unspezifisch an die IgG-Matrix gebunden haben und wurde durch die Waschschrte nur unzureichend entfernt.

Weiterhin wurde die Protein-Zusammensetzung des Rohextrakts, des ersten und des finalen Eluats der Tandem-Affinitätsreinigung von Zellsuspensionskulturen mittels Silberfärbung einer 1D-SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-3B). Die Zusammensetzung des Eluats war nach der Tandemaffinitäts-Proteinreinigung aufgrund der vielen verschiedenen gefärbten Proteinbanden im Gel noch sehr komplex. Die prominente Bande bei 23 kDa könnte der leichten Kette des Immunglobulin G entsprechen, das beim Waschschrte durch die reduzierenden Bedingungen mit von der Säule eluiert wird.

Aufgrund der nicht eindeutig erklärbaeren Artefakt-Bande, die zusätzlich in den zu isolierenden höhermolekularen Proteinkomplexen akkumulierte und sich damit negativ auf die Ausbeute der Protein-Anreicherung auswirkte, konnten die generierten Zellsuspensionskulturen nicht als Ausgangsmaterial verwendet werden.

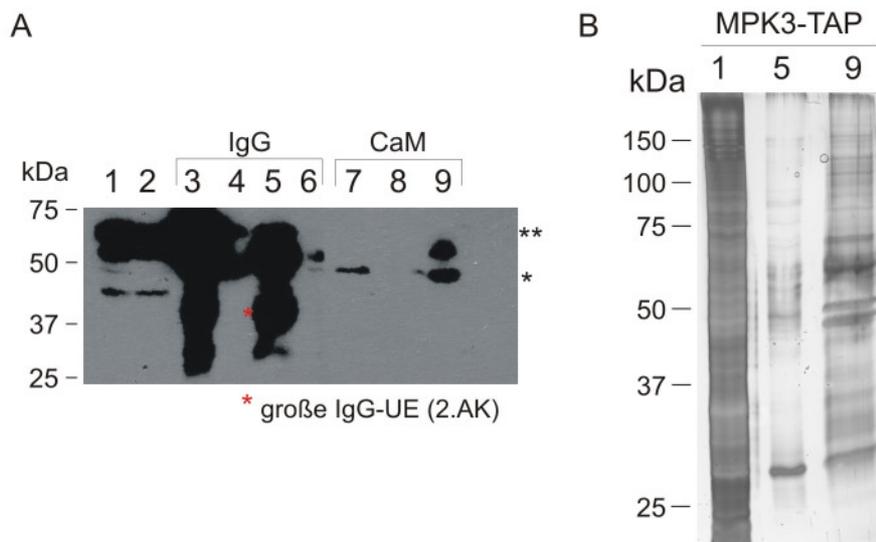


Abbildung 3-3 Tandemaffinitäts-Proteinreinigung von MPK3-TAP exprimierenden Zellsuspensionskulturen. Verschiedene Schritte und Eluate der Tandemaffinitäts-Proteinreinigung wurden mit 1D-SDS-PAGE und entweder Immuno-Blot (A, MPK3 Antiserum) oder Silberfärbung (B) analysiert. Die Sterne markieren das MPK3-TAP Protein bei 63 kDa (**) im Zellschulurextrakt und das angereicherte TEV-Protease Produkt MPK3-CBP (48 kDa, *) im finalen Eluat. (1, Gesamtproteinextrakt; 2-3, nicht-gebundene und gebundene Proteine; 4, eluierte IgG-Sepharose; 5, IgG-Eluat; 6-7, nicht-gebundene und gebundene Proteine; 8, eluierte Calmodulin-Sepharose; 9, Eluat)

3.1.2 Charakterisierung von Pflanzen-Transformanten

Pflanzen-Transformanten mit TAP-markierten Proteinen

Da die Zellsuspensionskulturen aufgrund der Ergebnisse nicht zur Affinitätschromatographie von MAPK Komplexen eingesetzt werden konnten, wurden ebenfalls stabile Arabidopsis Pflanzen-Transformanten generiert. Die verschiedenen Transformanten mit ihrem jeweiligen genetischen Hintergrund sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Sie wurden gänzlich in den entsprechenden *Knock-Out* Mutanten der MAPK generiert um die Konkurrenz der natürlichen MAPK zu vermeiden.

Tabelle 3-1 Transgene MAPK-TAP exprimierende Pflanzenlinien

genetischer Background	Quelle	Pflanzen-Transformanten (Referenz)
Col-0		35S::TAP
Ler-0		MPK4::MPK4-TAP 35S::MPK4-TAP
<i>mpk3</i> (Col-0)	B. Ellis (University of British Columbia, Vancouver, Canada)	MPK3::MPK3-TAP 35S::MPK3-TAP
<i>mpk4</i> (Ler-0)	J. Mundy (Petersen <i>et al.</i> 2000)	MPK4::MPK4-TAP
<i>mpk6</i> (Col-0)	SALK Institute (CA, USA)	MPK6::MPK6-TAP 35S::MPK6-TAP

Der Epitop-Tag wurde wiederum in allen Fällen C-terminal an das Zielprotein angefügt. Die Überexpression des TAP-Tags (35S::TAP) stellte die Vektorkontrolle dar, mit deren Hilfe abundante und unspezifisch bindende Proteine nach der Affinitäts-Chromatographie als falsch-positive ausgeschlossen werden konnten. Die Selektion geeigneter transgener Pflanzlinien für MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit (Spielau 2004). Die MAPK-TAP Proteine wurden in diesen Pflanzen dem natürlichen Level entsprechend exprimiert. Ein entsprechender Promotor-Bereich (1000-1500 bp) war bei der Klonierung abgeschätzt worden (G. Bethke). Da die Expression der MPK3- und MPK6-TAP Proteine unter dem starken 35S-Promotor nicht zu der gewünschten Überexpression führte (Daten nicht gezeigt), wurden diese Transformanten hier nicht verwendet.

Als Ausgangspunkt für die Generierung transgener MPK4::MPK4-TAP Pflanzen stand die phänotypisch auffällige *mpk4* Mutante zur Verfügung. Sie ist zwergwüchsig, besitzt krause Blätter und Blüten mit reduzierter Pollenproduktion und Fertilität. Die Mutante weist außerdem eine konstitutiv aktive SAR einschließlich erhöhtem Salizylsäure-Level, erhöhter Resistenz gegenüber virulenten Pathogenen und eine konstitutive Genexpression von *PR*-Genen auf (Petersen *et al.* 2000).

Die direkte Agrobakterium-vermittelte Transformation der *mpk4* Mutante mittels *Floral-Dip* Methode (Clough und Bent 1998) führte zu keiner stabilen positiven MPK4::MPK4-TAP Transformante (Spielau 2004). Deshalb wurden zunächst Ler-0 Wildtyp-Pflanzen mit dem MPK4-TAP-Konstrukt transformiert und selektiert. Anschließend wurde die *mpk4* Mutante mit den Ler/MPK4::MPK4-TAP Transformanten gekreuzt. Die erhaltenen Filialgenerationen wurden mittels BASTA-Applikation selektiert. Überlebende, normalwüchsige Pflanzen wurden auf DNA-Ebene mit PCR analysiert (Abbildung 3-4B, C). Dabei wurden homozygote *mpk4* Pflanzen selektiert, die zusätzlich das MPK4-TAP Konstrukt enthielten. Der Mutanten-Hintergrund konnte mittels Amplifikation eines Fragments des Ds-Elements validiert werden (Abbildung 3-4B). Dieses war in das *MPK4*-Gen integriert worden und führte zum *mpk4* *Knock-Out* (Petersen *et al.* 2000).

Um homozygote von heterozygoten Pflanzen unterscheiden zu können, wurden Oligonukleotide, die in zwei Intron-Regionen des *MPK4*-Gens hybridisierten, in der PCR-Analyse eingesetzt (Abbildung 3-4). Diese ergaben nur bei einem vollständigen *MPK4*-Gen ein Produkt. Das MPK4-TAP Konstrukt konnte mit TAP-spezifischen Oligonukleotiden auf DNA-Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 3-4C).

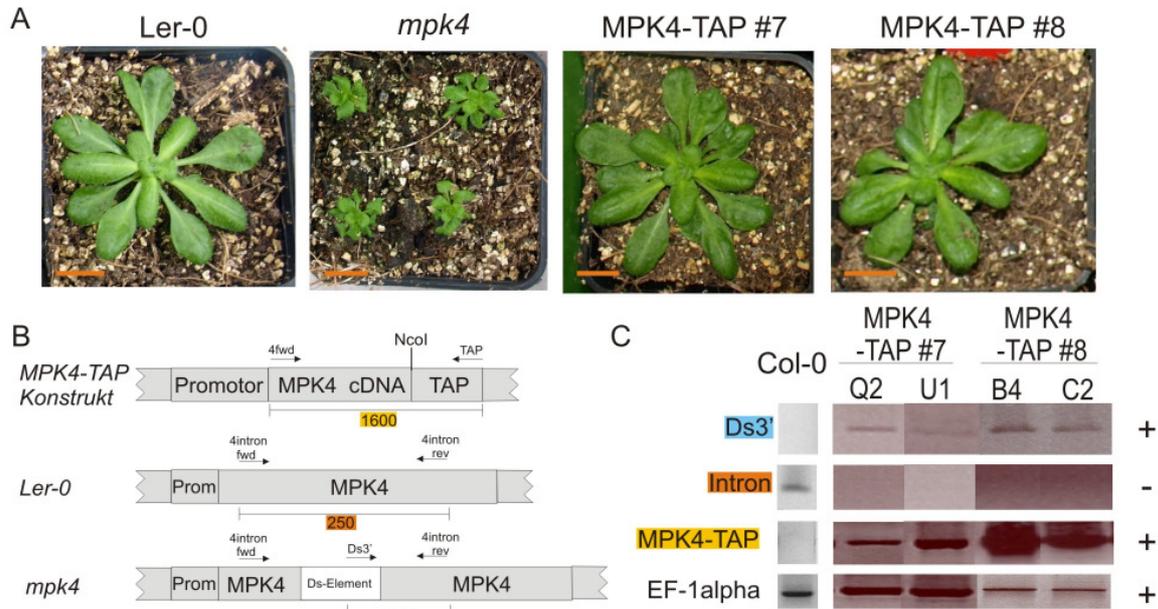


Abbildung 3-4 Selektion der MPK4::MPK4-TAP Transformanten

(A) Pflanzenwachstum von Ler-0, *mpk4* Mutante und zweier putativer MPK4::MPK4-TAP Pflanzen (#7, #8) auf Einheitserde. (B) DNA-Schema des MPK4-TAP Konstrukts im Vektor pCB302 sowie der Ler-0 und *mpk4* Pflanzen. Verwendete Oligopeptide sind mit Pfeilen gekennzeichnet, Zahlen geben entsprechende Fragment-Größen an. (C) Selektion der MPK4::MPK4-TAP Linie #7 (Pflanze Q2 und U1) und Linie #8 (Pflanze B4 und C2) mittels PCR Analyse der genomischen DNA.

Obwohl anhand der PCR-Analyse positive Transformanten selektiert wurden, konnte weder das Transkript (mRNA) noch das MPK4-TAP Protein in den putativen MPK4::MPK4-TAP Pflanzen nachgewiesen werden (Abbildung 3-5). Es wurden weder Fragmente für den TAP-Tag noch für das Konstrukt *MPK4-TAP* erhalten (Abbildung 3-5A). In allen putativen MPK4::MPK4-TAP Transformanten konnte jedoch das Transkript der endogenen *MPK4* bei 1100 bp detektiert werden. Diese konnte ebenfalls als Protein bei 43 kDa im Wildtyp Ler-0 detektiert werden und fehlte erwartungsgemäß in der *mpk4* Mutante.

Das MPK4-TAP Protein mit einem MG von 63 kDa wurde jedoch in keinem Fall detektiert. Weder mit einem Antiserum gegen die Protein A-Domäne des TAP-Tag noch mit dem MPK4-Antiserum konnte das MPK4-TAP Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3-5B, C). Jedoch wurden mit letzterem Signale in den putativen Transformanten detektiert, die dem MG des Wildtyp MPK4 Proteins (43 kDa) entsprachen. Da aber auch in der Vektorkontrolle sowie in den MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen auf dieser Höhe Signale erschienen (Abbildung 3-5B), könnten diese auch auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen sein.

Somit war die Komplementation des Zwerg-Phänotyps (Abbildung 3-4A) auf das Wildtyp *MPK4*-Gen zurückzuführen. Probleme bei der PCR mit den Intron-Oligonukleotiden (Abbildung 3-4C) könnten zur Selektion falscher Transformanten mit putativen homozygoten

mpk4 Hintergrund geführt haben. Da bereits MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen zur Verfügung standen, wurden die MPK4::MPK4-TAP-Transformanten verworfen.

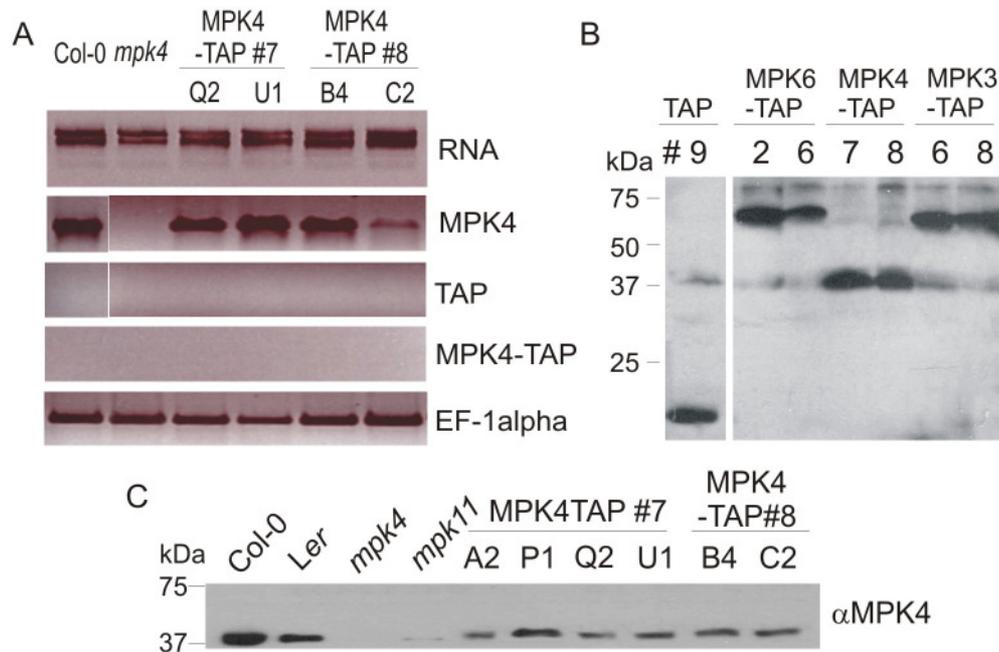


Abbildung 3-5 Charakterisierung der MPK4::MPK4-TAP Transformanten

(A) Extrahierte Gesamt-RNA (Zeile 1) aus Ler-0, *mpk4* und verschiedenen MPK4::MPK4-TAP Pflanzen (#7, #8) wurde in cDNA transkribiert und die Gensequenzen der *MPK4* (1100 bp), des *TAP*-Tag (550 bp) und des *MPK4-TAP* Konstruktes (1600 bp) mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation des Gens EF-1alpha (700 bp) diente als konstitutive Kontrolle. (B) Proteine aus verschiedenen MAPK-TAP Pflanzen (Vektorkontrolle TAP: 20 kDa, MPK3-TAP: 63 kDa, MPK4-TAP: 63 kDa, MPK6-TAP: 65 kDa) wurden extrahiert, in einer 1D-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und eine Immuno-Detektion mit dem anti-PAP Antiserum, das die Protein A Domäne des TAP-Tags detektierte, durchgeführt. (C) Immuno-Blot Analyse der Proteinextrakte aus verschiedenen MAPK-TAP Pflanzen (Linie 7#: Pflanzen A2, P1, Q2, U1; Linie #8: Pflanzen B4, C2) mit dem anti-MPK4 Antiserum (MPK4-TAP: 63 kDa, MPK4: 43 kDa).

Analyse der Funktionalität der TAP-markierten Proteine

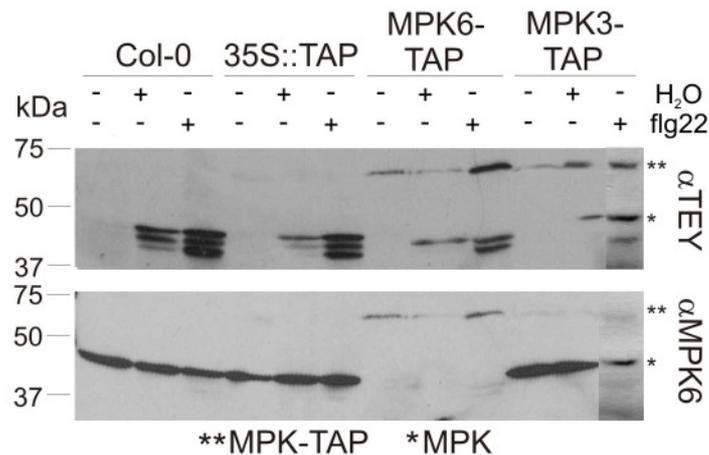
Um die Funktionalität der TAP-MAPK zu untersuchen wurden Pflanzen elizitiert, was zu einer Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste des für MAPK typischen TxY-Motivs führt (Nühse *et al.* 2000, Tena *et al.* 2001). Das TpEYp-Antiserum kann spezifisch dieses phosphorylierte TEY-Motiv der in Arabidopsis vorkommenden MAPK erkennen.

MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen wurden entweder nicht behandelt oder mit Wasser (Kontrolle) bzw. dem flg22-Peptid inokuliert. Die Elizitierung erfolgte für 10 min, da diese Zeitspanne bereits ausreichend für die Aktivierung der MPK3 und MPK6 war (Asai *et al.* 2002, Nühse *et al.* 2000). Pflanzenextrakte wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und die phosphorylierten MAPK mittels Immuno-Blot detektiert (Abbildung 3-6). Bei unbehandelten und kontrollbehandelten Pflanzenextrakten konnten keine bzw. nur schwache Banden detektiert werden. Die MAPK lagen nicht oder nur marginal phosphoryliert

vor. In Extrakten der MPK3-TAP sowie MPK6-TAP konnten in unbehandelten Proben Banden mit den entsprechenden MG bei 63 und 65 kDa detektiert werden (Abbildung 3-6 oben, anti-MPK6 Western unten). Die Proteine schienen auch ohne Stimulus bzw. unter Kontrollbedingungen teilweise phosphoryliert vorzuliegen, dennoch waren die Bandenintensitäten nach flg22-Elizitierung bei gleicher Protein-Mengenbeladung stärker.

Abbildung 3-6 Flg22-induzierte Phosphorylierung der MAPK-TAP Proteine

Pflanzen wurden entweder unbehandelt oder nach Wasser-Applikation (H₂O) bzw. flg22-Elizitierung (je 10 min) geerntet und die Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der anschließende Western-Blot erfolgte mit Antikörper, der spezifisch das phosphorylierte TEY-Motiv der MAPK detektierte.



Um zu testen, ob die MAPK-TAP Proteine in Komplexe integrierten, wurde wiederum eine Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt. Die Proteinextrakte wurden mittels einer nativen Gelfiltration an einem FPLC-System aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen über eine 1D-SDS-PAGE und Immuno-Detektion analysiert (Abbildung 3-7).

Die nicht-phosphorylierte und die durch flg22-Elizitierung aktivierte MPK3-TAP konnten marginal im höhermolekularen Bereich (100-300 kDa) detektiert werden, die Hauptmenge lag jedoch im monomeren Bereich bei 63 kDa (Abbildung 3-7 oben). Dieses Fraktionsprofil ist mit der MPK3 (43 kDa) im Wildtyp Col-0 vergleichbar (Abbildung 3-7 oben). Auch die Fraktionsprofile der MPK6 und MPK6-TAP sind vergleichbar, wobei die MPK6-Signale in höhermolekularen Fraktionen intensiver waren als bei der MPK6-TAP (Abbildung 3-7 unten). Das Bandenmuster der flg22-elizitierten Pflanzen unterscheidet sich kaum von unbehandeltem Material. Die TAP-markierten MPK3 und MPK6 verhielten sich ähnlich den Wildtyp MPK3 und MPK6, sie scheinen in vorhandene Proteinkomplexe integrieren zu können.

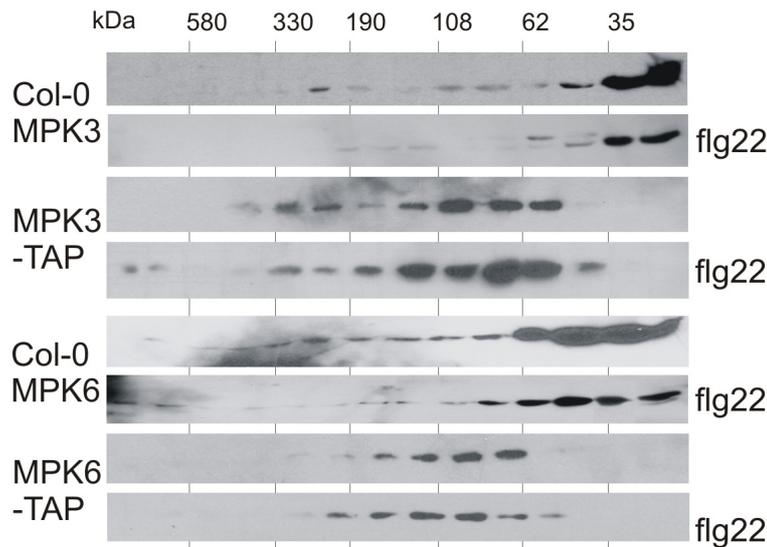


Abbildung 3-7 Hinweise auf die Integration von TAP-markierten MAPK in Proteinkomplexe Gelpermeations-Chromatographie mit Proteinextrakten nicht behandelter und elizitierter Col-0, MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen. Die Elizitierung erfolgte mit dem Peptid flg22 (10 μ M) für 10 min. Die Trennung und Analyse der Gesamtproteinextrakte aus dem Zellkulturmaterial erfolgte wie in Abbildung 3-2 beschrieben. Die MAPK wurden mit entsprechenden Antisera gegen MPK3 bzw. MPK6 nachgewiesen (Col-0 MPK3: 43 kDa, Col-0 MPK6: 45 kDa, MPK3-TAP: 63 kDa, MPK6-TAP: 65 kDa).

Um zu testen, ob die TAP-markierten MAPK *in vivo* mit bekannten Substraten interagieren können, wurde die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC, Bracha-Drori *et al.* 2004; Walter *et al.* 2004) angewendet. Die TAP-MAPK wurden dazu mit dem N-terminalen Teil des YFP (YFP^N, *yellow fluorescent protein*) fusioniert, die zu testenden Interaktionspartner dagegen mit dem C-terminalen Teil des YFP (YFP^C). Dabei wurden die mit MPK3 interagierenden Proteine VIP1 und PRP (VirE2-interagierendes Protein: Djamei *et al.* 2007, *prolin rich protein*: Kuhle 2008) und die mit MPK6 interagierenden Proteine NDPK2 und PRP (Nukleosid-Diphosphat Kinase 2: Moon *et al.* 2003, PRP: Kuhle 2008) eingesetzt. Während der Interaktion der Test-Proteine lagerten sich die YFP-Fragmente bei entsprechend räumlicher Nähe zusammen und bildeten ein korrekt gefaltetes YFP aus. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 500-520 nm konnten Zellen mit intakten YFP-Molekülen anhand von grün-gelbem YFP-Emissionslicht (Wellenlänge 535-565 nm) detektiert werden.

Arabidopsis thaliana Mesophyll-Protoplasten wurden parallel mit den YFP^N- und YFP^C-Fusionsproteinen sowie CFP (*cyan fluorescent protein*), das als Transfektionskontrolle diente, kointransfiziert. Die Transfektionen wurden je drei- bis viermal unabhängig voneinander wiederholt und ausgewertet. Die mikroskopischen Analysen erfolgten im Durchlicht/Hellfeld und unter Fluoreszenzbedingungen mit CFP- und YFP-Filter.

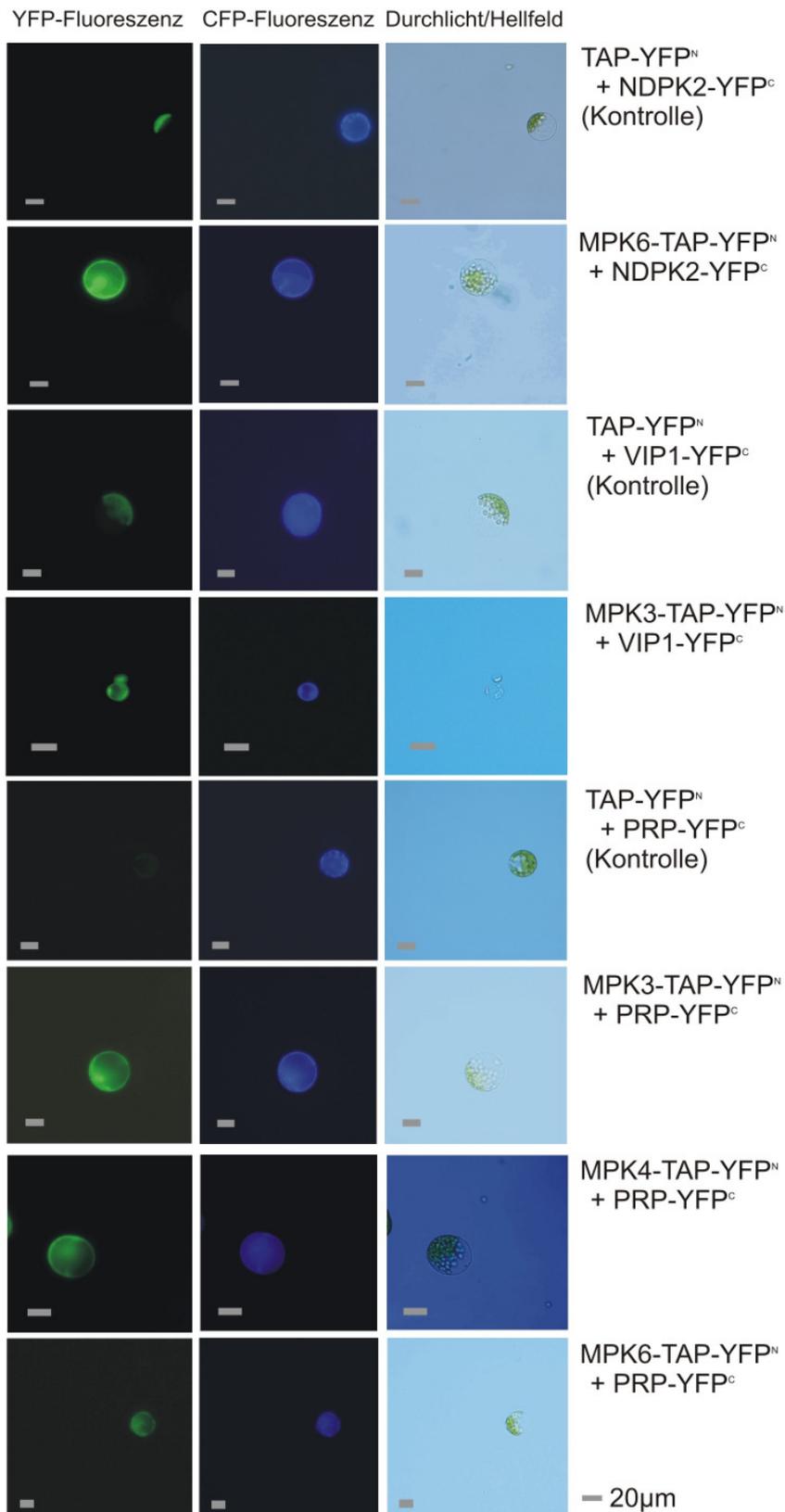


Abbildung 3-8 BiFC-Analyse der MAPK-TAP Proteine (Mikroskopische Aufnahmen)
 Analyse der Interaktion zwischen MPK3-TAP-YFP^N und den Substraten PRP-YFP^C und VIP1-YFP^C, MPK4-TAP-YFP^N und dem Substrat PRP-YFP^C sowie MPK6-TAP-YFP^N und den Substraten NDPK2-YFP^C und PRP-YFP^C. Als Kontrolle wurde TAP-YFP^N jeweils mit den Substraten ko-exprimiert. Die Fluoreszenz des CFP und YFP der transfizierten Protoplasten wurde bei 40facher Vergrößerung an einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

Die Protoplasten wurden zunächst auf ihre CFP-Fluoreszenz hin analysiert. Die transfizierten Protoplasten wurden anschließend mit Licht der Wellenlänge 500-520 nm angeregt. Einige Beispiele der mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

Zur statistischen Analyse wurde die Gesamtzahl der Protoplasten im Hellfeld/Durchlicht bestimmt (ca. 300 pro Ansatz) und der Anteil der transfizierten Zellen anhand der CFP-Fluoreszenz bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde aus dem Anteil der transformierten an der Gesamtzahl der Protoplasten berechnet. Sie lag meist zwischen 10 und 30%.

Im Diagramm (Abbildung 3-9) ist der prozentuale Anteil der YFP-fluoreszierenden Protoplasten (gelb) an den insgesamt transfizierten Protoplasten (blau) dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei bis vier Replikate an. Die Daten wurden auf ihre Normalverteilung hin getestet und mit Hilfe einer ANOVA Analyse in Klassen (Anhang Tabelle A-1) eingeteilt. Dabei entspricht die Gruppe A dem optimalen Zustand, dass 100% der transfizierten Protoplasten eine YFP-Fluoreszenz aufweisen. Die Klasse E stellt den optimalen Fall dar, dass nur ein sehr niedriger Anteil an YFP-Fluoreszenz unter den Protoplasten detektierbar war. Die Mischklassen BC und CD konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, sie stellen Intermediäre zwischen den jeweiligen Einzelklassen dar.

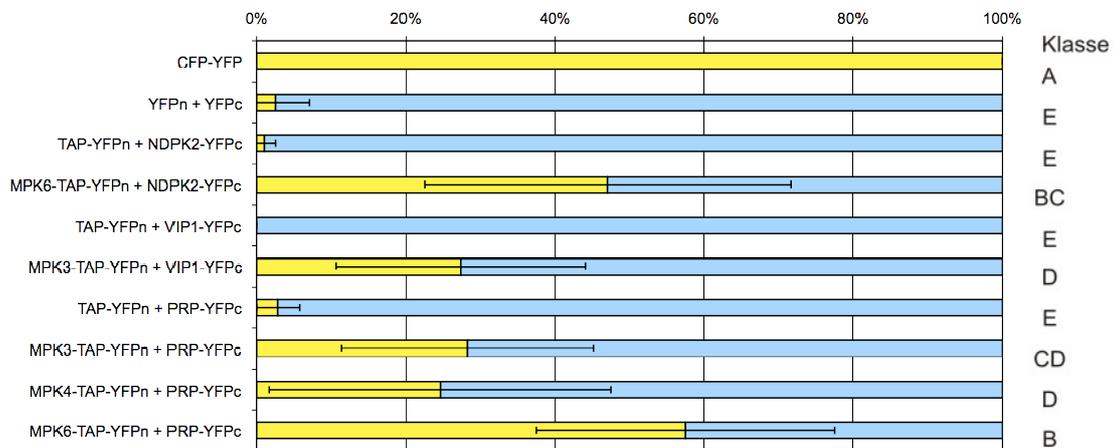


Abbildung 3-9 BiFC-Analyse der MAPK-TAP Proteine (Diagramm)

Übersicht der Analyse der Interaktion zwischen MAPK-TAP-YFP^N und den entsprechenden MAPK-Substraten (YFP^C). Als Kontrolle wurde TAP-YFP^N jeweils mit den Substraten ko-exprimiert. Die Anzahl der CFP-fluoreszierenden Mesophyll-Protoplasten wurde auf 100% gesetzt, davon ist der Anteil der YFP-fluoreszierenden Protoplasten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von je vier unabhängigen Experimenten (je >300 Protoplasten) an. Die Klasse stellt die mittels ANOVA Analyse zugeordneten Signifikanzklassen A bis E dar, wobei A 100% YFP-Fluoreszenz unter den transformierten Protoplasten entspricht. Die Signifikanzklasse E entspricht der Negativ-Kontrolle.

Nach der Ko-Transfektion von MPK6-TAP mit dem spezifischen Substrat NDPK2 wiesen 47,09% der transformierten Protoplasten eine YFP-Fluoreszenz auf, bei der gleichzeitigen

Expression von MPK3-TAP mit dem Substrat VIP1 fluoreszierten 27,37% auf diese Art. Gleichmaßen zeigte die Expression des putativen Substrates PRP mit der MPK3-TAP (28,28%), MPK4-TAP (24,63%) und MPK6-TAP (57,51%) einen erhöhten YFP-fluoreszierenden Anteil an der Gesamtzahl der transformierten Protoplasten. Diese Protein-Paare akkumulierten in den Signifikanzklassen B bis D und deuteten auf eine erfolgreiche Interaktion zwischen den jeweiligen Protein-Partnern hin.

Im Vergleich dazu lag der Anteil an YFP-Fluoreszenz bei den Kontrollen (TAP-Tag mit entsprechenden Substraten) in jedem Fall unter 3% (Abbildung 3-6). Die Vektor-Kontrollen akkumulierten in der Signifikanz-Klasse E.

Pflanzen-Transformanten mit strepII-markierten Proteinen

Die das Protein MPK6-strepII über-exprimierenden Pflanzen wurden durch Transformation der *mpk6* Mutante mit dem Konstrukt 35S::MPK6-strepII generiert (T. Unthan). Die Selektion der MPK6-strepII exprimierenden Pflanzen erfolgte über PCR (Daten nicht gezeigt) und Immuno-Detektion (Abbildung 3-10).

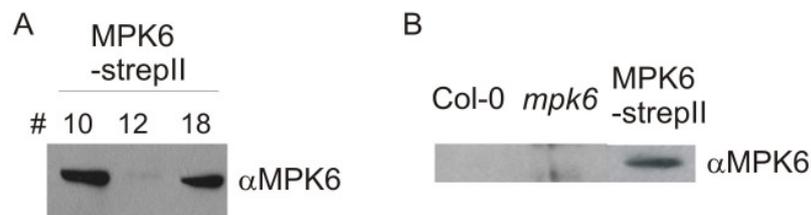


Abbildung 3-10 Charakterisierung der 35S::MPK6-strepII Transformanten

(A) Die Auswahl der Transformanten erfolgte über eine Immuno-Blot Analyse. Die MPK6-strep Varianten wurden spezifisch über das MPK6-Antiserum (α MPK6) detektiert. (B) MPK6-strepII Proteine konnten spezifisch präzipitiert werden. Proteinextrakte wurden über die StrepTactin-Sepharose immunopräzipitiert und anschließend mittels Immuno-Detektion mit MPK6-Antiserum (α MPK6) analysiert.

Analyse der Funktionalität der strepII-markierten Proteine

Im Anschluss an die Selektion der transgenen Pflanzenlinien erfolgte eine Funktions-Analyse der MPK6-strepII Proteine. Der strepII-Epitoptag besteht aus einem kleinen Oktapeptid, was die Wahrscheinlichkeit sterischer Hinderungen gering hält. Er sollte weder einen nennenswerten Einfluss auf die Kinase-Aktivität noch auf die Fähigkeit der markierten Proteine, in Proteinkomplexe zu integrieren, haben.

Im Rahmen der Funktionsanalyse erfolgte die Validierung der flg22-induzierten Phosphorylierung der MPK6-strepII wiederum mit einer Immuno-Detektion und einem Kinase Aktivitäts-Assay (Abbildung 3-11). Proteine wurden nach der entsprechenden Behandlung extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im anschließenden Immuno-Blot mit dem

TpEYp-Antiserum konnten bei unbehandelten Pflanzen keine phosphorylierten MAPK detektiert werden. Unter Kontrollbedingungen erschienen sowohl die endogene MPK3 (43 kDa) als auch die MPK6-strepII (45 kDa) geringfügig aktiviert vorzuliegen. Die Bandenintensitäten der MAPK nach flg22-Elizitierung waren jedoch bei gleicher Protein-Mengenbeladung am stärksten (Abbildung 3-11 oben).

Die durch das phosphorylierte TEY-Motiv aktivierte MPK6-strepII konnte das artifizielle MAPK Substrat MBP (*myelin basic protein*) phosphorylieren. Die Proteine wurden entweder mittels StrepTactin-Sepharose oder über den an ProteinA-Sepharose immobilisierten MPK6-Antikörper präzipitiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung des Substrates MBP mit radioaktiv markiertem ATP analysiert. Dazu wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel anschließend mit einem Phosphor-Imager gescant (Abbildung 3-11 unten).

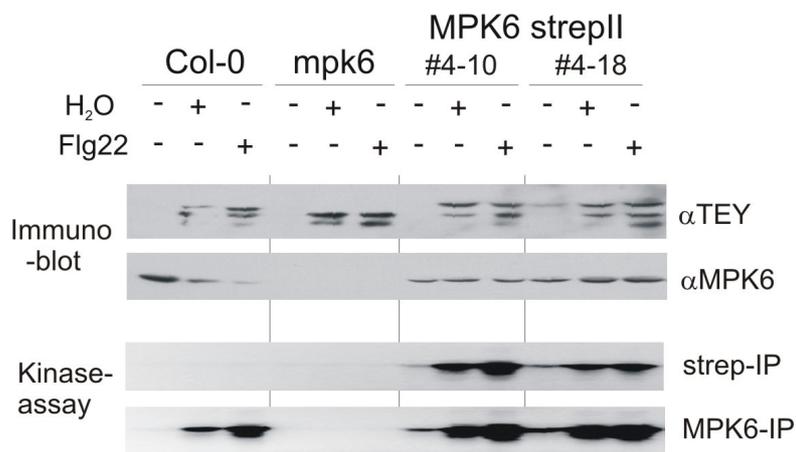


Abbildung 3-11 Flg22-induzierte Phosphorylierung der MPK6-strepII Proteine
 Pflanzen wurden entweder unbehandelt oder nach Wasser-Applikation (H₂O) bzw. flg22-Elizitierung (je 10 min) geerntet und Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Immuno-Detektion (oben) erfolgte mit einem Antiserum, das spezifisch das phosphorylierte TEY-Motiv der MAPK erkannte (α TpEYp oben). Im Kinase-Assay (unten) wurde die Fähigkeit der MPK6-strepII zur Umsetzung des artifiziellen Substrates MBP (*myelin basic protein*) analysiert. Dazu wurden die MPK6-strepII Proteine entweder mittels immobilisiertem anti-MPK6 Antikörper oder über StrepTactin-Sepharose präzipitiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit MBP in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP, eine 1D-SDS-PAGE und die Analyse der Gele im Phosphor-Imager.

Mittels der StrepTactin-Sepharose konnten nur in den Transformanten aktive MPK6-Proteine präzipitiert werden, nicht jedoch aus Col-0 oder *mpk6* Kontroll-Pflanzen (Abbildung 3-11 unten links). An Protein A-Sepharose immobilisierte MPK6-Antikörper präzipitierten sowohl aus dem Wildtyp Col-0 als auch aus den StrepII-Transformanten aktive MPK6 Proteine. Die immobilisierten MPK6 Proteine aus unbehandelten Pflanzen konnten in keinem Fall das Substrat MBP umsetzen. Nach der Kontrollbehandlung mit Wasser konnte ein geringfügiger

Phosphorylierungs-Grad des Substrates MBP detektiert werden, was auf Verwundungsreaktionen während der Wasser-Applikation in Rosettenblätter zurückgeführt werden kann. Die Bandenintensität an umgesetzttem MBP war jedoch nach vorheriger flg22-Elizitierung am stärksten (Abbildung 3-11 unten).

Hinweise auf die Existenz von MAPK-strepII Proteinkomplexen wurden wiederum mittels Gelpermeations-Chromatographie evaluiert (vgl. 3.1). Gesammelte Fraktionen wurden mittels 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und die MPK6-strepII Proteine mit Immuno-Detektion analysiert. Die Verteilung des MPK6 Proteins aus Col-0 unter den Extraktionsbedingungen der Strep-Proteinreinigung ergab fast ausschließlich Signale im Bereich der MPK6 Monomere (45 kDa, Abbildung 3-12). Die MPK6-strepII Proteine konnten in den gleichen Fraktionen (um 45 kDa) detektiert werden.

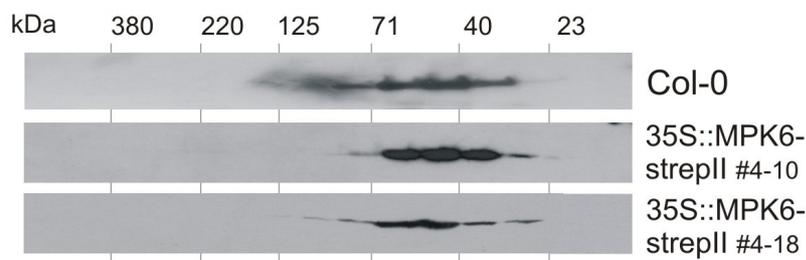


Abbildung 3-12 Hinweise auf die Integration von MPK6-strepII in Proteinkomplexe
Gelpermeations-Chromatographie mit Proteinextrakten nicht behandelter Col-0 und MPK6-strepII Pflanzen. Die Trennung und Analyse der Gesamtproteinextrakte aus dem Blattmaterial erfolgte wie in Abbildung 3-2 beschrieben (Laufpuffer: 100 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 10% (v v⁻¹) Glycerin; pH 8). Die MAPK wurden mit einem Antiserum gegen MPK6 nachgewiesen.

3.2 Chromatographische Anreicherung von Proteinkomplexen

Da schließlich nur Rosettenblätter von Pflanzentransformanten als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden konnten und das Protein RuBisCO bis zu 50% des Proteoms einer Pflanze einnehmen kann (Xi *et al.* 2006, Cellar *et al.* 2008), wurde eine Fraktionierung der Pflanzenextrakte in Betracht gezogen. Gleichzeitig kann damit die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung gering konzentrierter Proteine erhöht werden.

3.2.1 Möglichkeiten zur Extraktion und Stabilisierung von Proteinkomplexen

Der Extraktionspuffer enthielt verschiedene zusätzliche Ingredienzien, damit die extrahierten Proteinkinasen und ihre Komplexe intakt blieben. Protease-Inhibitoren verhinderten den Abbau der Proteine, Phosphatase-Inhibitoren den Verlust von bestehenden Phosphorylierungen. Da die MPK3 und MPK6 Proteine bereits sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern

lokalisiert werden konnten (Bethke *et al.* 2009), wurde der Zusatz vom Detergenz NP-40 untersucht, mit dessen Hilfe der Aufschluss aller Zellmembranen sichergestellt werden sollte. Der Einfluss des Extraktionsmilieus auf die Stabilität der MAPK Komplexe wurde mittels Gelpermeations-Chromatographie analysiert (Abbildung 3-13). Dabei zeigte sich kein Unterschied der MAPK-Verteilung auf die Fraktionen in Extrakten mit oder ohne Detergenz-Zusatz. Ein NP-40 Zusatz im Extraktionspuffer schien also keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der putativen MAPK Komplexe zu haben.

Zur Abreicherung sehr abundanter Proteine in Pflanzenextrakten wurde die Methode der Fraktionierung ausgewählt. Die Fraktionierungen mittels Polyethylenglykol und Ammoniumsulfat erfüllten dabei die Voraussetzungen zum Einsatz vor einer Affinitätschromatographie: sie ermöglichten eine native Proteinpräzipitation. Der Einfluss der verschiedenen Bedingungen auf die MAPK Proteinkomplexe wurde wiederum mittels Gelpermeations-Chromatographie analysiert.

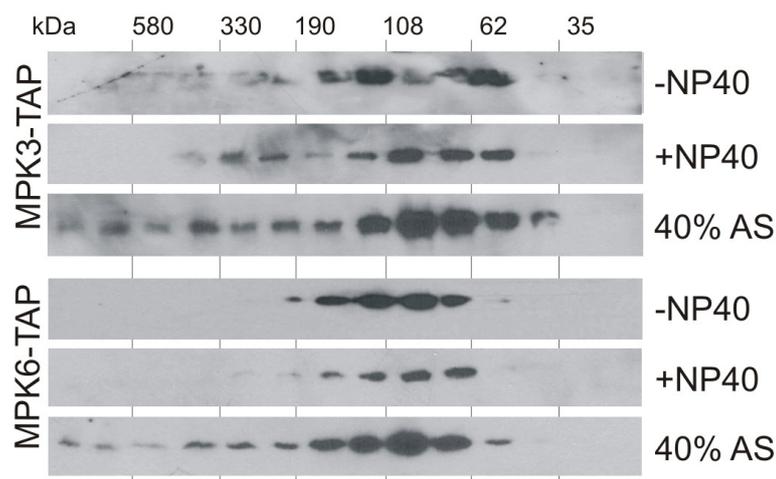


Abbildung 3-13 Hinweise auf die Integration von angereicherten MAPK-TAP Proteinen in Komplexe
Vergleich der Gelpermeations-Chromatographie verschiedener Proteinextrakte aus Col-0, MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen, die entweder unbehandelt oder elizitiert (10µM flg22-Peptid, 10 min) waren. Die Extrakte enthielten entweder nur die löslichen Proteine (Detergenz-frei) oder entsprachen Totalextrakten (+ NP40) und wurden teilweise vorfraktioniert (40% Ammoniumsulfat-Pellet). Die Trennung und Analyse erfolgte wie in Abbildung 3-2 beschrieben. Die MAPK wurden entsprechend mit Antiseren gegen MPK3 (A) und MPK6 (B) detektiert.

Die MPK3-TAP und MPK6-TAP Proteinextrakte wurden aufgrund der besseren Trennung von der RuBisCO mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Bei einer Konzentration von 40% Ammoniumsulfat im Extraktionspuffer präzipitierten die beiden getesteten Proteine, wohingegen die RBCL, die große Untereinheit der RuBisCO (50 kDa), weitestgehend in Lösung verblieb (Abbildung 3-14A). Die sedimentierten MAPK-TAP Proteine wurden anschließend wieder in einem kleinen Volumen Puffer resolubilisiert und weiterverarbeitet.

Die MPK6-strepII Proteinextrakte wurden mit PEG fraktioniert. Nach Zugabe von 20% PEG waren die MPK6-strepII Proteine im Überstand zu detektieren (Abbildung 3-14B). Die RuBisCO befand sich unter diesen Bedingungen im Sediment und konnte so von der MPK6-strepII separiert werden (Abbildung 3-14B). Der PEG-Überstand wurde anschließend gegen den Strep-Extraktionspuffer ohne Inhibitoren für drei Stunden dialysiert und weiterverarbeitet.

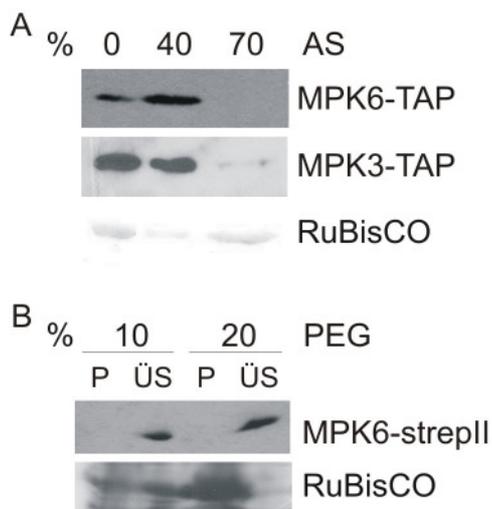


Abbildung 3-14 Vorfraktionierung von Proteinextrakten

(A) Proteinextrakte aus MPK6::MPK6-TAP und MPK3::MPK3-TAP Blattmaterial wurden nacheinander auf 0, 40 und 70% Ammoniumsulfat eingestellt und sedimentiert. Proteinextrakte aus MPK6-strepII Blattmaterial wurden auf 10 oder 20% PEG (B) eingestellt und sedimentiert. Nach der Gelelektrophorese der einzelnen Fraktionen erfolgte eine Immuno-Detektion mit entsprechenden Antisera gegen MPK3 und MPK6. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit Amidoschwarz angefärbt (jeweils unten). Der Ausschnitt fokussiert auf die Bande bei 50 kDa (RBCL).

Der Einfluss der nativen Präzipitation auf die Stabilität der MAPK Komplexe wurde anschließend mittels Gelpermeations-Chromatographie analysiert (Abbildung 3-13). Die Analyse von resolubilisierten Ammoniumsulfat- (40%) Proteinpräzipitaten wies insgesamt intensivere Signale in den Fraktionen für die MPK3 und MPK6 auf. Hier könnten aufgrund der Fraktionierung die MAPK Proteinkomplexe in höheren Konzentrationen vorgelegen haben.

Zur Analyse der Stabilität der zu isolierenden Proteinkomplexe wurden Fraktionen mit putativen MAPK Proteinkomplexen erneut über die Gelfiltration aufgetrennt. Dazu wurden Fraktionen, die einem MG-Bereich von ca. 190 bis 600 kDa entsprachen, nativ mittels Ammoniumsulfat-Fällung aufkonzentriert und erneut chromatographiert. Nach der Re-Chromatographie konnten die Proteine MPK3 und MPK6 sowohl im Bereich der Monomere als auch in den höhermolekularen Fraktionen detektiert werden (Abbildung 3-15). Das könnte auf ein bestehendes, stabiles Gleichgewicht zwischen MAPK Monomeren und höhermolekularen Komplexen hindeuten.

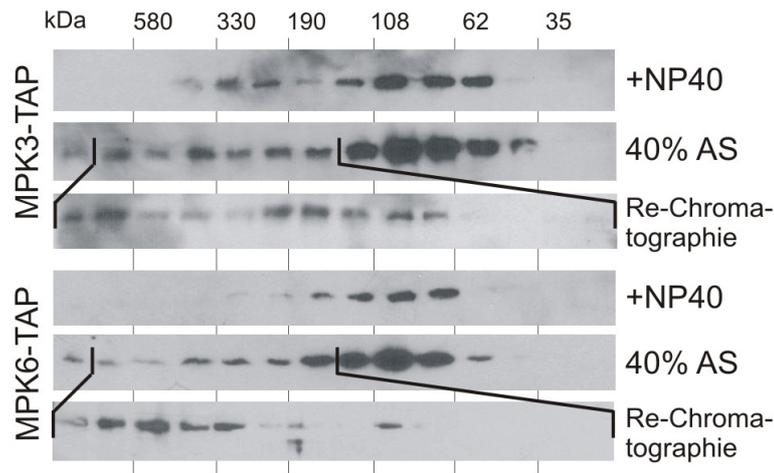


Abbildung 3-15 Re-Chromatographie vorfraktionierter Proteinkomplexe

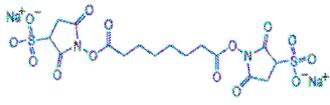
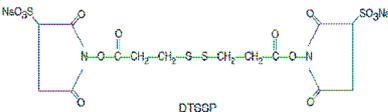
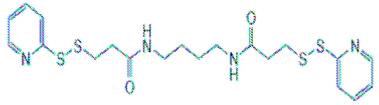
Vergleich der Gelpermeations-Chromatographie von unbehandelten, vorfraktionierten (40% Ammoniumsulfat-Pellet) Proteinextrakten aus MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen mit der Re-Chromatographie von hochmolekularen Proteinen und Komplexen. Die Trennung und Analyse erfolgte wie in Abbildung 3-2 beschrieben. Die Rechromatographie erfolgte mit den präzipitierten Proteinen der angegebenen Fraktionen (190 bis 770 kDa). Diese Proteine wurden mit 40% Ammoniumsulfat nativ sedimentiert, resolubilisiert und anschließend unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt und analysiert. Die MAPK wurden entsprechend mit Antiseren gegen MPK3 (A) und MPK6 (B) detektiert.

Chemische Vernetzer

Der Einsatz von chemischen Vernetzern bietet eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung relevanter Proteinkomplexe (Gingras *et al.* 2007). Voraussetzung für die erfolgreiche Vernetzung von Proteinen ist das Vorhandensein entsprechender funktioneller Gruppen in exponierten Aminosäureseitenketten. Diese müssen in ausreichender Zahl an der Oberfläche der globulären Proteinstrukturen frei zugänglich vorliegen und in räumlicher Nähe zueinander liegen. Zu lange Vernetzer-Moleküle können unspezifische Quervernetzungsreaktionen bedingen, weshalb die spezifische Länge für das entsprechende Anwendungsgebiet optimiert werden muss. Weiterhin sollten die Quervernetzer aufgrund der sich anschließenden massenspektrometrischen Analysen bevorzugt spaltbar sein.

Zur chemischen Vernetzung bieten sich primäre Amine an, wie sie zum Beispiel bei Lysin-Seitenketten vorkommen. MPK3 und MPK6 weisen zahlreiche Lysine in ihrer Proteinsequenz (16 bzw. 15 K) auf. Es besteht folglich eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Lysin-Seitenketten der beiden MAPK auf der Proteinoberfläche frei für Vernetzungsreagenzien zugänglich sind. Der TAP-Tag enthält 19 Lysin-Reste, was unspezifische Quervernetzung ermöglicht. Zur Verbindung freier Amingruppen wurden zwei verschiedene Vernetzer ausgewählt, BS³ und DTSSP (Tabelle 3-2). Beide Reagenzien bilden kovalente Amidbindungen aus. DTSSP ist im Gegensatz zum nicht spaltbaren BS³ intramolekular in Gegenwart von Thiolen spaltbar.

Tabelle 3-2 Ausgewählte Quervernetzer

<i>BS³</i> <i>Bis[sulfosuccin-imidyl] suberate</i>	<i>DTSSP</i> <i>3,3'-Dithio-bis [sulfosuccin-imidyl-propionate]</i>	<i>DPDPB</i> <i>1,4-di-[3'-(2'-pyridyl)dithio) propionamido]butane</i>
		
$C_{16}H_{18}N_2O_{14}S_2Na_2$	$C_{14}H_{14}N_2O_{14}S_4Na_2$	$C_{20}H_{24}N_4O_2S_4$
spacer 11.4 Å vernetzt Amine nicht spaltbar	spacer 12.0 Å vernetzt Amine spaltbar mit Thiolen	spacer 19.9 Å vernetzt Sulphydrylgruppen spaltbar mit Thiolen

Auch freie SH-Gruppen bieten eine Möglichkeit zur chemischen Quervernetzung. In der MPK3- bzw. MPK6-Aminosäuresequenz kommen je sechs Cysteine vor, im TAP-Tag dagegen ist keines vorhanden. Der Vernetzer DPDPB (Tabelle 3-2) reagiert mit Sulphydrylgruppen, was zu einer spaltbaren Disulfid-Verbrückung der Proteine führt. Der Vorteil dieses Vernetzers ist die Möglichkeit der thermodynamischen Verlagerung des *Spacers* zwischen freien Cystein-Seitenketten. Nachteilig auf die Effizienz der Vernetzung wirken sich intramolekulare Disulfid-Brücken aus.

Proteinextrakte von MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen wurden mit BS³, DTSSP und DPDPB vernetzt und Proteine mittels 1D-SDS-PAGE, Silberfärbung und Immuno-Detektion visualisiert (Abbildung 3-16). Bei steigenden DTSSP- und BS³-Konzentrationen verstärkten sich die Protein-Bandenintensitäten in dem Bereich >75 kDa, wohingegen die Proteinbanden im Bereich <50 kDa schwächer wurden bzw. nicht mehr detektierbar waren (Abbildung 3-16A), was für eine erfolgreiche Vernetzung und damit Stabilisierung von höhermolekularen Proteinkomplexen spricht. Die Vernetzung der Proteinkomplexe war reversibel. DTSSP-vernetzte Proteinextrakte wurden vor der 1D-SDS-PAGE mit Probenpuffer (5% BME) aufgekocht, um die Vernetzer-Moleküle zu spalten. Die entsprechend behandelten Proben waren nach Silberfärbung hinsichtlich des auftretenden Protein-Bandenmusters vergleichbar mit unbehandelten Proteinextrakten (Daten nicht gezeigt).

Mit steigenden Konzentrationen des Vernetzers DPDPB konnten nur marginale bis keine Veränderungen im Protein-Bandenmuster im Vergleich zum unbehandelten Extrakt detektiert werden (Abbildung 3-16A). Unbehandelte und erfolgreich vernetzte Proteinextrakte wurden zusätzlich mittels Gelelektrophorese und Immuno-Detektion der MAPK-TAP analysiert. In Gegenwart der Vernetzer waren die Signale der MPK3-TAP und MPK6-TAP Monomere bei 63 bzw. 65 kDa schwächer als bei unbehandelten Proben (Abbildung 3-16B).

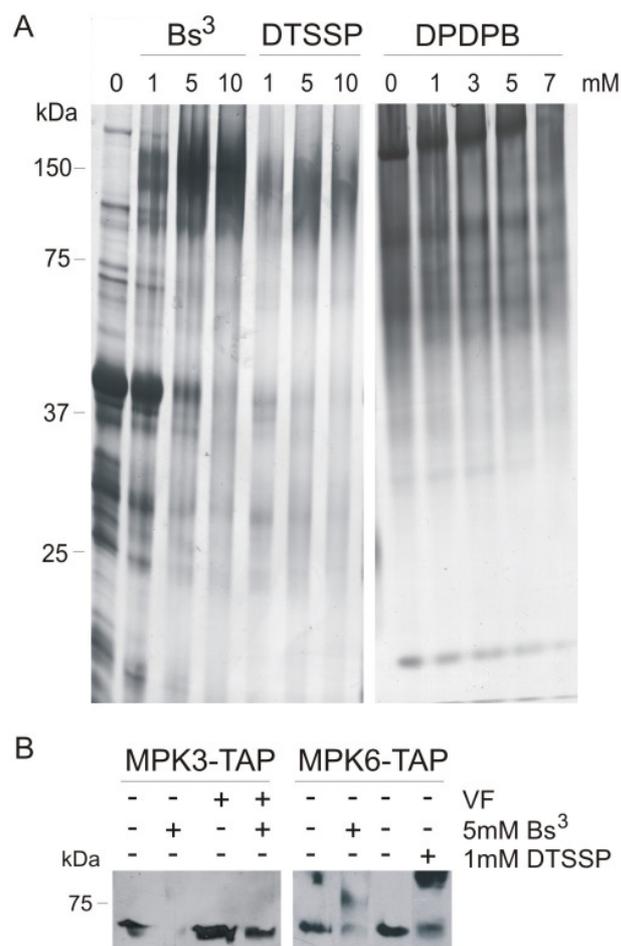


Abbildung 3-16 Chemische Quervernetzung von MAPK-TAP Proteinen

Vergleich unbehandelter und vernetzter MPK3-TAP und MPK6-TAP Proteinextrakte.

Gesamtproteinextrakte wurden mit den entsprechenden Vernetzern (Bs³, DTSSP, DPDPB) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte eine native (DPDPB) bzw. 1D-SDS-PAGE (Bs³, DTSSP). Die Proteine wurden mittels Silberfärbung visualisiert (A).

Die Immuno-Detektion (B) erfolgte mit entsprechendem MPK3- bzw. MPK6-Antiserum (VF Vorfraktionierung).

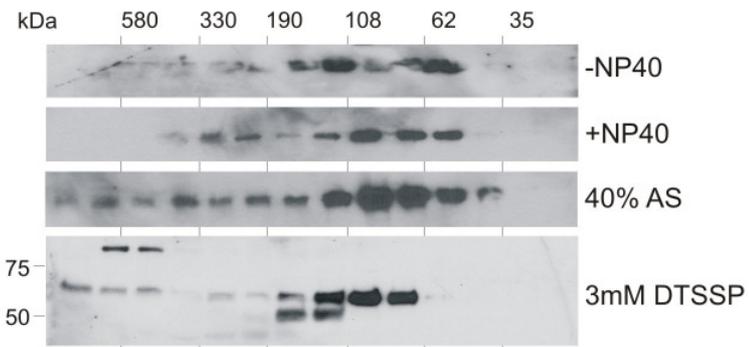
Diese Ergebnisse deuten auf eine Stabilisierung und Akkumulation von höhermolekularen Komplexen mittels DTSSP und Bs³ hin, was mittels Gelpermeations-Chromatographie von vernetzten MPK3-TAP Proteinextrakten validiert werden konnte. Dabei wurden Proteinextrakte mit DTSSP vernetzt, chromatographiert und der Vernetzer vor der SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen gespalten um eine Immuno-Detektion der Monomere zu ermöglichen. Darin konnte das MPK3-TAP Protein hauptsächlich in Fraktionen detektiert werden, die dem monomeren MG des Proteins entsprechen (63 kDa).

Zusätzlich konnten im Bereich von 580 kDa Banden der MPK3-TAP detektiert werden (Abbildung 3-17), was auf eine Stabilisierung von möglichen Proteinkomplexen hinweisen könnte. In diesem Bereich konnten auch nach der Vorfraktionierung von Proteinextrakten (40% Ammoniumsulfat-Präzipitat) Signale detektiert werden, nicht jedoch in unbehandelten Protein-Gesamtextrakten (Abbildung 3-17). Zusätzlich wurden in den höhermolekularen Fraktionen Signale im Bereich von 100 kDa detektiert werden. (Abbildung 3-17) Diese könnten auf eine nicht-vollständige Spaltung des DTSSP Moleküls zurückzuführen sein.

Einige der MPK3-TAP Proteine könnten mit einem oder mehreren anderen Proteinen assoziiert vorliegen, was einen Subkomplex eines bei circa 580 kDa liegenden Komplexes darstellen könnte.

Abbildung 3-17 Hinweise auf die Stabilisierung von MPK3-TAP Proteinkomplexen mittels chemischer Vernetzung

Vergleich der Gelpermeations-Chromatographie von unbehandelten, fraktionierten (40% Ammoniumsulfat Präzipitat) und chemisch vernetzten Proteinextrakten aus MPK3::MPK3-TAP Pflanzen. Die Trennung und Analyse der Gesamtproteinextrakte erfolgte wie in Abbildung 3-2 beschrieben. Das MPK3 Protein wurde mit dem MPK3-Antiserum detektiert (MPK3-TAP 63 kDa).



3.2.2 Tandem-Affinitätschromatographie

Die Tandemaffinitäts-Aufreinigung von Proteinkomplexen erfolgte aus unbehandelten Pflanzen-Transformanten, um die optimalen Bedingungen für die Proteinreinigung zu validieren. Die erfolgreiche Durchführung der Proteinreinigung wurde wiederum über eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine aller Zwischenschritte verfolgt. Anschließend wurden die Proteine mittels Immuno-Detektion beziehungsweise 1D-SDS-PAGE und Silberfärbung visualisiert. Die Proteine MPK3-TAP und MPK6-TAP konnten jeweils im Gesamtproteinextrakt, dem ersten Eluat und im finalen Eluat detektiert werden. Das bedeutet, dass die Proteinreinigung erfolgreich war. Das MG der MAPK-TAP verkleinerte sich dabei nach der ersten Affinitätschromatographie von 63 auf 48 kDa (MPK3-TAP) bzw. von 65 auf 50 kDa (MPK6-TAP), da bei der ersten Elution ein Teil des TAP-Epitoptags abgespalten wurde (Abbildung 1-4, Abbildung 3-18A, oben).

Anschließend wurden die Zusammensetzung der Eluate aus der Tandemaffinitätsreinigung von MPK3::MPK3-TAP, MPK6::MPK6-TAP und Vektorkontroll-Pflanzen (im Folgenden als TAP-Eluate bezeichnet) verglichen. Die durch Silberfärbung visualisierten Bandenmuster wiesen beim Vergleich mit der Vektorkontrolle nur marginale Unterschiede auf (Abbildung 3-18B), jedoch konnten in der anschließenden MS-Analyse eindeutige Unterschiede zwischen den Proben detektiert werden (siehe Abschnitt 3.3).

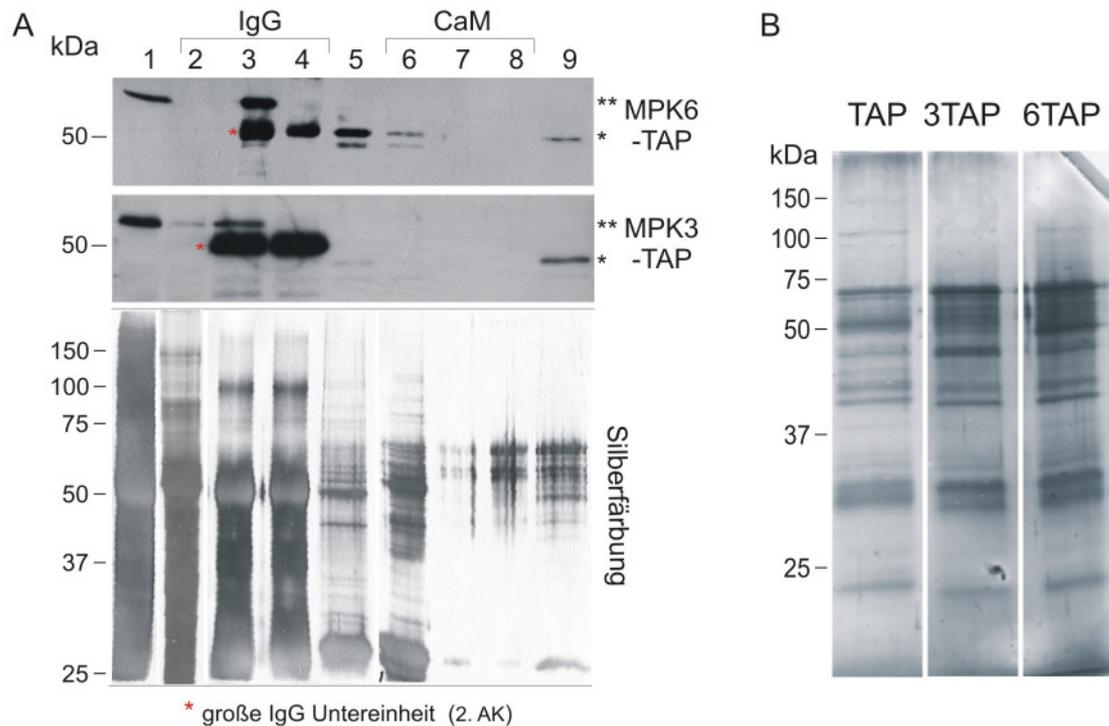


Abbildung 3-18 Tandem-Affinitätschromatographie der MAPK-TAP Proteine

Die Tandem-Affinitätschromatographie wurde mit Extrakten aus MPK3::MPK3-TAP (3TAP), MPK6::MPK6-TAP (6TAP) und der Vektorkontrolle (TAP) durchgeführt. Verschiedene Proteinreinigungsschritte und die Eluate wurden mit 1D-SDS-PAGE und entweder Immuno-Detektion (A oben) oder Silberfärbung (A unten und B) analysiert. Die Sterne markieren jeweils die MPK-TAP Proteine (**, MPK3-TAP 63 kDa bzw. MPK6-TAP 65 kDa) und das angereicherte TEV-Protease Produkt MPK-CBP (*, 48 bzw. 50 kDa) im finalen Eluat. (1, Gesamtproteinextrakt; 2-3, nicht-gebundene und gebundene Proteine; 4, eluierte IgG-Sepharose; 5, IgG-Eluat; 6-7, nicht-gebundene und gebundene Proteine; 8, eluierte Calmodulin-Sepharose; 9, Eluat)

Die Tandemaffinitäts-Proteinreinigung wurde anschließend mit vorfraktionierten (40% Ammoniumsulfat Präzipitat) Gesamt-Proteinextrakten durchgeführt. Dabei wurden wiederum alle Teilschritte mittels Immuno-Detektion der MAPKs und Silberfärbung der 1D-SDS-PAGE analysiert. Im Vergleich zu den TAP-Eluaten konnten deutliche Unterschiede im Bandenmuster der Eluate aus der Tandem-Affinitätschromatographie mit vorfraktionierten Pflanzenextrakten (VF-TAP-Eluate) detektiert werden (Abbildung 3-19). Insbesondere waren bei den VF-TAP-Eluaten einige Banden im Bereich von 40 bis 60 kDa intensiver. Eine der großen Untereinheit der RuBisCO entsprechende Bande bei 50 kDa war in den VF-TAP-Eluaten schwächer ausgeprägt als bei den TAP-Eluaten (Abbildung 3-19).

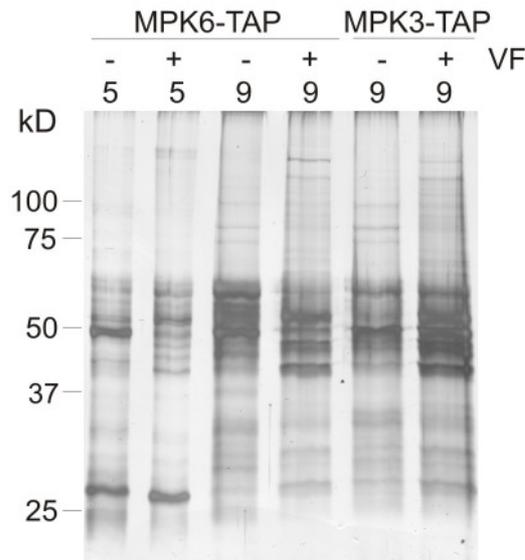


Abbildung 3-19 Einfluss der Vorfraktionierung auf die Tandemaffinitäts-Chromatographie

Vergleich der Tandemaffinitäts-Reinigung von nicht-fraktionierten und vorfraktionierten (40% Ammoniumsulfat, VF) Proteinextrakten. Das erste (IgG-, 5) und finale (9) Eluat der Tandemaffinitäts-Proteinreinigung wurde über eine 1D-SDS-PAGE separiert und die Proteine durch Silberfärbung visualisiert.

3.2.3 StrepII-Affinitätschromatographie

Da bei der Analyse der Tandem-Affinitätschromatographie kaum visuelle Unterschiede zwischen der Vektorkontrolle und den Proben in den Bandenmustern der Eluate (1D-SDS-PAGE-Silberfärbung) auftraten wurde eine weitere Affinitätschromatographie über einen anderen Epitop-Tag untersucht. Die Ergebnisse aus beiden Strategien könnten anschließend miteinander verglichen werden was die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung von MAPK Interaktoren erhöhen kann.

Die Strep-Proteinreinigung wurde zunächst mit unbehandeltem Pflanzenmaterial durchgeführt. Die Gesamt-Proteinextrakte aus Rosettenblättern wurden entweder direkt oder nach einer PEG Vorfraktionierung (20% Überstand) mit anschließender Dialyse mit der StrepTactin-Sepharose inkubiert. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels 1D-SDS-PAGE und anschließender Immuno-Detektion bzw. Silberfärbung analysiert (Abbildung 3-20).

Das Protein MPK6-strepII konnte im Gesamtproteinextrakt, im Überstand der 20% PEG-Präzipitation und sowohl im Strep-Eluat als auch im Eluat der Strep-Affinitätschromatographie mit PEG-fraktionierten Proteinextrakten (VF-Strep-Eluate) detektiert werden. Die Proteinreinigung war also erfolgreich (Abbildung 3-20A). Allerdings waren die verwendeten Reinigungs-Konditionen nicht optimal, da im Durchfluss der StrepTactin-Sepharose noch MPK6-strepII Proteine detektiert werden konnten.

Ein Vergleich der Bandenmuster in der 1D-SDS-PAGE der beiden Eluate aus MPK6-strepII und *mpk6* Pflanzen ergab zwar nur geringe Unterschiede (Abbildung 3-20B, Spur 5 und 6), trotzdem konnten in der MS-Analyse Unterschiede detektiert werden (Vgl. Abschnitt 3.3).

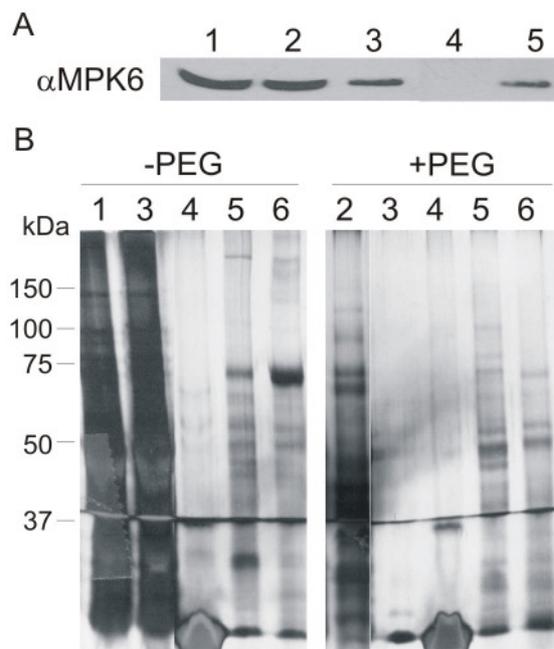


Abbildung 3-20 Affinitäts-Chromatographie der MPK6-strepII

Die Strep-Proteinreinigung wurde mit Extrakten aus 35S::MPK6-strepII (1-5), und der Kontrolle *mpk6* durchgeführt. Anschließend wurden verschiedene Reinigungsschritte sowie die Eluate mittels 1D-SDS-PAGE und entweder Immuno-Detektion (A) oder Silberfärbung (B) analysiert. (1, Gesamteinextrakt; 2, vorfraktionierter Proteinextrakt (20% PEG-Überstand), 3-4, Durchfluss und eluierte StrepTactin-Sepharose; 5, finales Eluat MPK6-strepII; 6, finales Eluat der *mpk6* Kontrolle)

3.3 Identifizierung ko-gereinigter Proteine

Die ko-gereinigten Proteine wurden mit TCA präzipitiert und anschließend entweder insgesamt in Lösung tryptisch verdaut zur Durchführung von *Shotgun*-Analysen oder über eine 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer zur Massenspektrometrie kompatiblen Silberfärbung visualisiert (Abbildung 3-21). Protein-Gelbanden wurden ausgeschnitten, entfärbt und im Gel proteolytisch mit Trypsin gespalten (1D-Gel/LC-MS/MS oder kurz GeLC).

Die proteolytischen Peptide wurden über eine 1D-nano-Flüssig-Chromatographie aufgetrennt und anschließend mit ESI-IT-MS/MS analysiert (HCT Ultra, Bruker Daltonic; Abbildung 3-21). Die erzeugten MS-Spektren wurden mit dem Programm *DataAnalysis* (Version 2.0) prozessiert und die erhaltenen Daten anschließend mit den *in silico* verdauten Proteinsequenzen in der MASCOT Datenbank verglichen. Über eine Zuordnung von Peptidionen-Massen konnten damit die Proteine identifiziert werden, die sich in den Protein-Eluaten befanden. Dabei wurden den identifizierten Proteinen Score-Werte zugeordnet, die den Grad der Überlappung der experimentellen mit den theoretischen MS-Spektren angeben.

Das Signifikanz-Niveau der Protein-Identifizierungen aus LC-MS/MS-Daten wurde mit Hilfe des Programms Scaffold bestimmt (Abbildung 3-21). Dieses Programm wurde zur Einordnung der auf den Tandem-MS-Daten basierenden Peptid- und Proteinidentifikationen genutzt. Dabei wurden nur die Identifizierungen akzeptiert, die eine Protein-Wahrschein-

lichkeit von >99% und mindestens zwei zugeordnete Peptide mit einer Wahrscheinlichkeit von >95% aufwiesen.

Schließlich wurden Proteine, die ausschließlich in den Kontrollen detektiert wurden und damit dem Hintergrund entsprachen, systematisch von der Liste ko-eluierter Proteine subtrahiert. Die finalen Protein-Listen wurden mit komplementären Interaktionsstudien verglichen und ausgewertet.

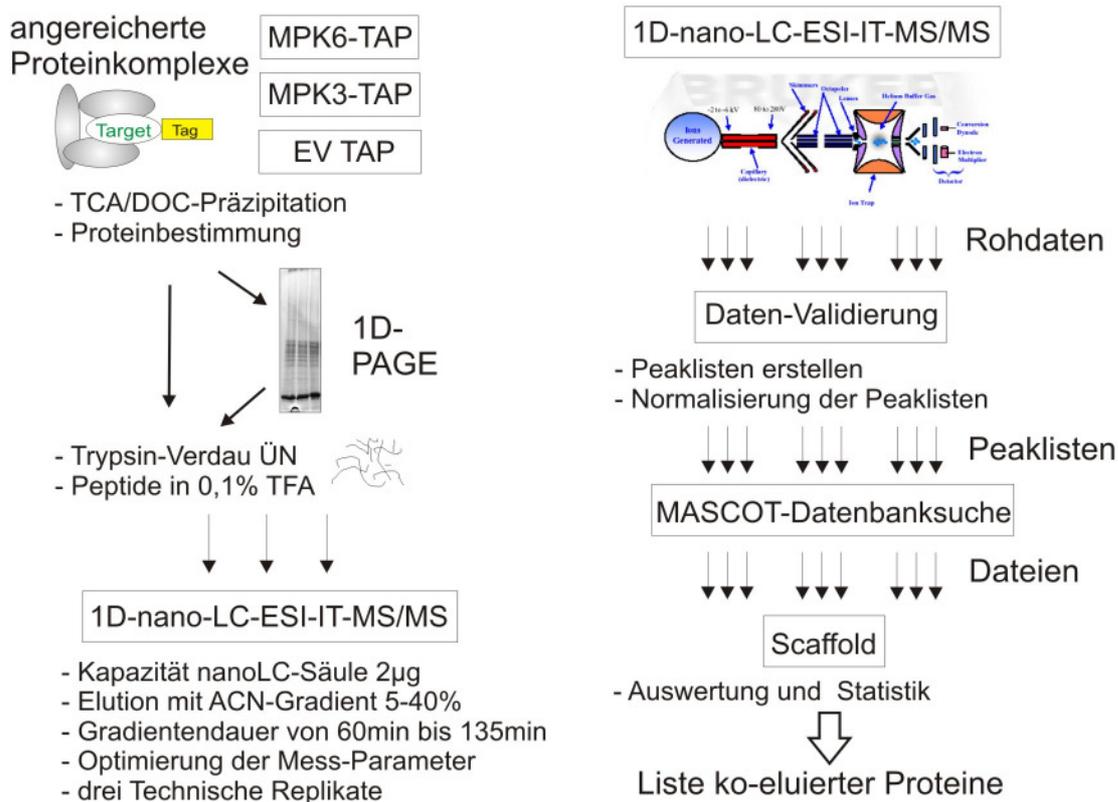


Abbildung 3-21 Schema der massenspektrometrischen Analyse

Nach der Affinitäts-Proteinreinigung wurden zunächst die Proteine mittels TCA-Fällung präzipitiert. Anschließend folgte entweder eine elektrophoretische Trennung der Proteine mit anschließendem Trypsin-Verdau im Gel (GeLC-Analyse) oder der direkte Trypsin-Verdau aller Peptide in Lösung für *Shotgun*-Analysen. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels 1D-nano-LC-ESI-IT-MS/MS (HCT Ultra, Bruker Daltonic). Die Daten-Prozessierung erfolgte mit dem Programm *DataAnalysis*. Mittels der MASCOT-Software und der ATH_PROT Datenbank basierend auf TAIR7 bzw. TAIR8 wurden Proteine identifiziert und die Proteinlisten anschließend mit der Software Scaffold ausgewertet.

3.3.1 Protein-Identifizierungen nach Tandem-Affinitätschromatographie

Tandem-Affinitätschromatographie und 1D-Gel/LC-MS/MS Analyse (GeLC Analyse)

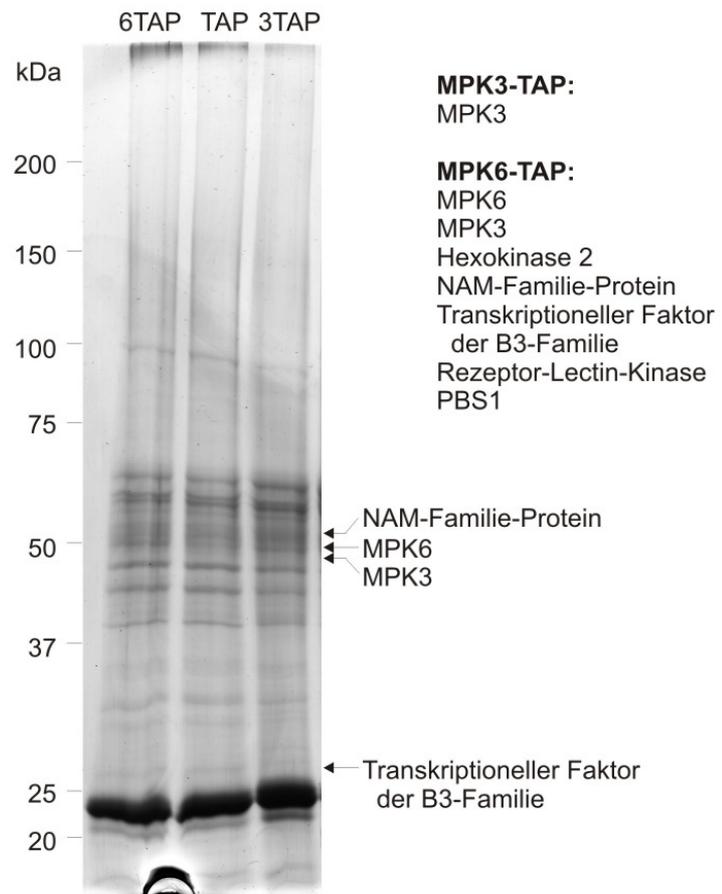
Die Tandem-Affinitätschromatographie wurde anfänglich mit Gesamt-Proteinextrakten aus je 360 g Pflanzenmaterial der MPK3::MPK3-TAP, MPK6::MPK6-TAP und 35S::TAP Transformanten nach dem TAP-Protokoll sukzessive aufgereinigt. Die angereicherten Proteine wurden parallel mit 1D-Gel/LC-MS/MS und *Shotgun* analysiert. Die proteolytischen Peptide wurden mit einem Acetonitril-Gradienten von 2-40% über einen Zeitraum von 30 min in der Nano-LC aufgetrennt und *online* mittels ESI-MS/MS analysiert. Die Protein-Identifizierungen erfolgten mit der MASCOT Software und einer Arabidopsis-Datenbank basierend auf TAIR7. Die in der Vektorkontrolle identifizierten Proteine wurden als Kontaminanten definiert, sie umfassten hochabundante Proteine wie die RuBisCO, RuBisCO Aktivase, ribosomale, chloroplastidäre und Strukturproteine sowie metabolische Enzyme und wurden manuell von den Protein-Listen der MPK3-TAP und MPK6-TAP subtrahiert.

Abbildung 3-22 Vergleich der Eluate aus MPK3-TAP, MPK6-TAP und EV TAP Tandem-Affinitätschromatographie

360 g Pflanzenmaterial der MPK3::MPK3-TAP (3TAP), MPK6::MPK6-TAP (6TAP) und 35S::TAP (TAP) Transformanten wurden nach dem TAP-Protokoll aufgereinigt. Die angereicherten Proteine wurden präzipitiert, über eine 1D-SDS-PAGE separiert und durch Silberfärbung visualisiert. Banden wurden ausgeschnitten, Proteine im Gel mit Trypsin verdaut und die Peptide anschließend extrahiert. Die Auftrennung der proteolytischen Peptide erfolgte über eine 1D-nano-LC (ACN-Gradient 2-40%, 30 min) mit anschließender ESI-IT-MS/MS Analyse.

Die Pfeile (←) geben die Lage der Gelbanden an, aus denen in den entsprechenden Proben spezifische Proteine identifiziert wurden.

Die Liste rechts fasst MPK-spezifischen Protein-Identifizierungen aus der *Shotgun*-Analyse (LC ACN-Gradient 30min) und einer parallel durchgeführten GeLC-Analyse zusammen.



Die Analyse der Proteinbanden, die Molekülmassen von 20 bis 300 kDa umfassten, ergab nur wenige MAPK-spezifische Identifizierungen. So konnten die MPK3 und MPK6 im gelfreien Ansatz (*Shotgun*-MS) als auch bei der GeLC in der jeweiligen Probe identifiziert werden (Abbildung 3-22). Als ko-gereinigte Proteine konnten die HXK2 (At2g19860, Hexokinase 2, Sensor für pflanzliche Zucker-Stressantwort, 54 kDa), ein NAM-Familie-Protein (At5g04400, enthält NAC-Domäne, DNA-Bindung, 54 kDa), ein Transkriptionsfaktor der B3-Familie (At4g31660, DNA-Bindung, 29 kDa), eine Rezeptor-Lectin-Kinase (At2g37710, durch Salizylsäure induziert, 75,5 kDa) und PBS1 (At5g13160, *avrPphB susceptible1*, 50 kDa) identifiziert werden (Abbildung 3-22).

Tandem-Affinitätschromatographie und Shotgun-Analyse

Die Tandem-Affinitätschromatographie wurde mit Gesamt-Proteinextrakten aus je 90 g MPK3::MPK3-TAP, MPK6::MPK6-TAP und Vektorkontrolle 35S::TAP Pflanzenmaterial in je zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden mit TCA präzipitiert, in Verdauopuffer gelöst und mit Trypsin über Nacht verdaut. Die Peptidgemische wurden anschließend über nano-LC mit einem Acetonitril-Gradienten von 2-40% über einen Zeitraum von 120 min aufgetrennt und direkt mittels ESI-IT-MS/MS analysiert. Es erfolgten drei technische Replikate der LC-MS/MS-Messungen je Experiment.

Die MS-Daten wurden einzeln prozessiert und anschließend damit eine MASCOT Datenbanksuche (Datenbank: ATH_PROT_TAP basierend auf TAIR7) durchgeführt. Somit konnten die Proteine identifiziert werden, die sich in der jeweiligen Probe befanden. Die verschiedenen MASCOT-Datensätze wurden schließlich zusammen in das Programm Scaffold (Proteome-Software) geladen und zusammen ausgewertet.

Bei der *Shotgun*-Analyse der TAP-Eluatate konnten insgesamt 632 Spektren und 455 Peptide detektiert werden. Daraus leiten sich 79 Protein-Identifikationen ab, von denen 44 je in einer oder mehreren Proben (MPK3-TAP, MPK6-TAP und TAP-Vektorkontrolle) präsent waren. Ein Protein wurde als präsent bezeichnet, wenn dafür in allen drei LC-MS/MS-Replikaten je zwei Peptide mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% identifiziert werden konnten.

Rund die Hälfte (27) der Proteine trat in allen Datensätzen auf (Abbildung 3-23). 80% der 44 Protein-Identifizierungen wurden in der Vektorkontrolle detektiert, sie wurden als Kontaminanten veranschlagt. Sie umfassten metabolische, strukturelle, ribosomale sowie chloroplastidär lokalisierte Proteine (Anhang Tabelle A-3). Etwa 20% der in den drei Proben präsenten Protein-Identifizierungen waren spezifisch für eine oder beide MAPK.

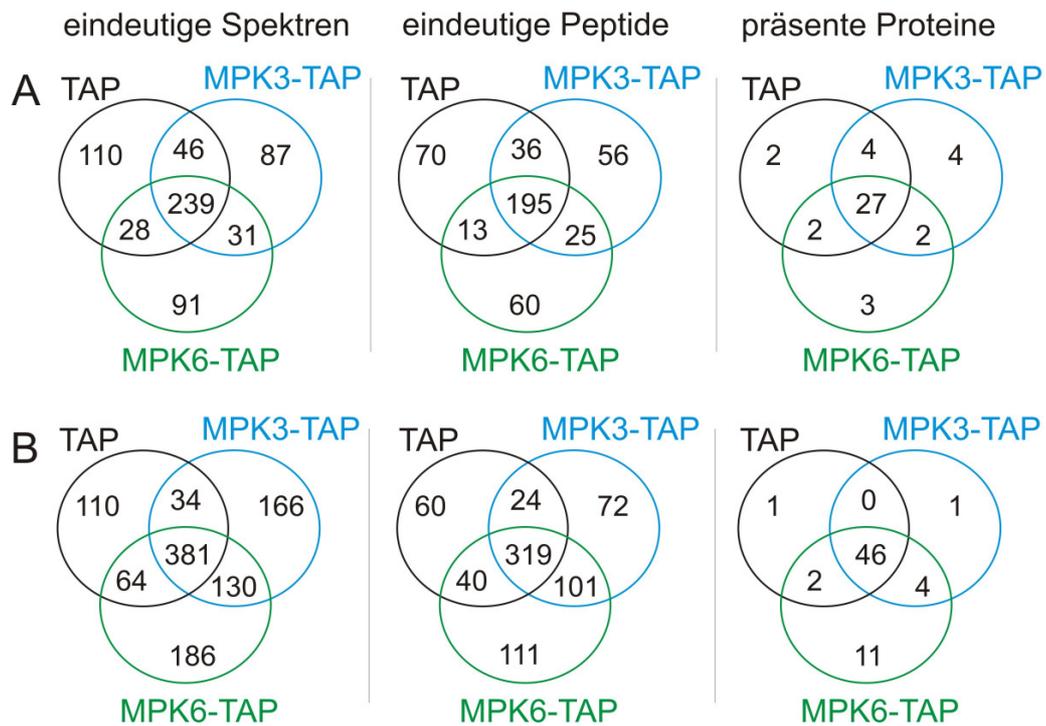


Abbildung 3-23 Auswertung der Tandem-Affinitätschromatographie Gesamt- (A) oder vorfraktionierte (B, 40% Ammoniumsulfat-Präzipitat) Proteinextrakte aus je 90 g MPK6::MPK6-TAP, MPK3::MPK3-TAP und 35S::TAP Pflanzenmaterial wurden mittels Tandem-Affinitäts-Chromatographie gereinigt und eluierte Proteine anschließend mit Trypsin verdaut. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine nano-LC (ACN-Gradient 2-40%, 120 min) mit anschließender ESI-IT-MS/MS (Triplikate). Die Venn-Diagramme veranschaulichen die Verteilung der gesamten aufgenommenen eindeutigen Spektren sowie der eindeutig identifizierten Peptide. Die Protein-Identifizierungen geben die Anzahl der in je ein oder mehreren Proben präsenten Proteine an.

In den MPK3::MPK3-TAP Pflanzen wurden neben der MPK3 (At3g45640) mit einer Sequenzabdeckung (SA) von 21% weitere drei Proteine identifiziert: At2g07698 (ATP Synthase Alpha Kette, SA 4%), At3g17390 (S-Adenosylmethonin-Synthetase, SA 16%) und At5g30510 (ribosomales Protein S1, SA 6,5%).

Die Proteine At5g56010 (HSP81-3, SA 9-13%) und At5g56030 (HSP81-2, SA 9-13%) traten in beiden MAPK Proben auf. Aus den MPK6::MPK6-TAP Pflanzen konnten die Proteine MPK6 (At2g43790, SA 9%), At2g39800 (Delta1-Pyrroline-5-Carboxylat Synthase, SA 8%) und At1g76180 (*early response to dehydration* 14, SA 31%) identifiziert werden (Tabelle 3-3).

Aufgrund der Komplexität der MS-Proben wurde eine weitere Mess-Methode zur Detektion der Peptide herangezogen. Dabei wurden mit Hilfe einer Peptid-Ausschlussliste (SPL, *scheduled precursor list*) die bereits detektierten Peptide in einer zweiten MS-Messung derselben Probe ausgeschlossen. Diese Peptide wurden nicht mehr im Massenspektrometer zur weiteren Fragmentierung in der Ionenfalle ausgewählt und keine MS/MS-Spektren aufgenommen.

Die SPL-MS-Messungen wurden beispielhaft mit MPK6-TAP Eluaten durchgeführt (Triplikate). Gegenüber den bereits erwähnten Daten konnten mittels SPL 29 zusätzliche

Spektren aufgenommen werden, die in 15 weiteren Peptiden resultierten. Zwar erreichten die SPL-MS-Messungen damit das Ziel, mehr Peptide durch den Ausschluss der sehr abundanten Peptide identifizieren zu können. Es ist jedoch fraglich, ob dieses Verfahren ausreicht, um niedrig abundante Peptide in einer komplexen Mischung zu identifizieren. Die zusätzlichen Peptide ergaben keine weiteren Protein-Identifizierungen und führten damit nur zu einer erhöhten Sequenzabdeckung.

Einfluss der Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung auf die Protein-Identifizierungen

Die Tandem-Affinitätschromatographie wurde ebenfalls mit vorfraktionierten (40% Ammoniumsulfat Präzipitat) Gesamt-Proteinextrakten aus je 90 g MPK3::MPK3-TAP, MPK6::MPK6-TAP und 35S::TAP (Vektorkontrolle) Pflanzenmaterial durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden wie bereits beschrieben für die *Shotgun*-Analyse vorbereitet (TCA-Präzipitation, Trypsin-Verdau, LC: ACN-Gradient 2-40% über 120 min, Triplikate).

Es konnten insgesamt 1071 eindeutige Spektren, 727 Peptide und 122 Proteine in den TAP-Eluaten mit Vorfraktionierung identifiziert werden, von denen 65 in den drei Proben präsent waren. Insgesamt konnten in den TAP-Eluaten mit Vorfraktionierung gegenüber denen ohne 439 Spektren, 123 Peptide und 43 Proteine zusätzlich detektiert werden (Abbildung 3-23).

75% der präsenten Proteine konnten in der Vektorkontrolle TAP detektiert werden und stellten wiederum Kontaminanten dar (Abbildung 3-23). In den MPK3::MPK3-TAP Pflanzen wurden insgesamt fünf Proteine identifiziert, jedoch nur die MPK3 wurde ausschließlich in diesen Pflanzen identifiziert (At3g45640, SA 19%, Abbildung 3-24).

Die Proteine Glutamat Decarboxylase 2 (At1g65960, SA 27% bzw. 21%), *Embryo defective* 2394 (At1g05190, SA 23% bzw. 14%), Phospho-ribulokinase (At1g32060, SA 16% bzw. 19%) und Chloroplast 30S ribosomales Protein S8 (Atcg00770, SA 39%) traten in beiden MAPK Proben auf. Aus den MPK6::MPK6-TAP Pflanzen konnten weiterhin auch die MPK6 (At2g43790, SA 9%) und 11 weitere Proteine identifiziert werden (Tabelle 3-3, Abbildung 3-24). Es gab jedoch weder bei der MPK3-TAP noch bei der MPK6-TAP Überlappungen der identifizierten ko-eluierten Proteine aus den TAP- und VF-TAP-Eluaten (Abbildung 3-24).

Tabelle 3-3 Protein-Identifizierungen aus der Tandem-Affinitätschromatographie mit und ohne Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung

<i>AGI Code</i>	<i>MPK3-TAP</i>		<i>MPK6-TAP</i>		<i>Name</i>	<i>Funktion, zelluläre Lokalisation (GO Annotierung)</i>
	<i>-VF</i>	<i>+VF</i>	<i>-VF</i>	<i>+VF</i>		
At3g45640	×	×			MPK3	Bakterien-Antwort, MAP Kinase-Aktivität
At2g07698	×				ATP Synthase, alpha-Kette	Chloroplast
At3g17390	×				S-Andenosylmethionin-Synthetase	Plasma-Membran
At5g30510	×				ribosomales Protein S1	Ribosom (strukturell)
At5g56010	×		×		HSP81-3	ATP Bindung, Membran
At5g56030	×		×		HSP81-2	ATP Bindung, Mitochondrion
At1g65960		×		×	Glutamat Decarboxylase 2	Metabolismus
At1g05190		×		×	<i>embryo defective 2394</i>	Ribosom
At1g32060		×		×	Phosphoribulo-Kinase	Bakterien-Abwehr, Chloropl.
Atcg00770		×		×	Ribosomales Protein	Chloroplast
At2g39800			×		Delta1-Pyrroline-5-Carboxylat Synthase	Membran
At2g43790			×	×	MPK6	Bakterien-Antwort, MAP Kinase-Aktivität
At1g76180			×		<i>early response to dehydration 14</i>	Chloroplast
At5g17920				×	Methionin-Synthase	Salz-Stressantwort, Cd-Ionen Antwort, Cu-Ionen Bindung, Chloroplast
At5g09810				×	Actin Gen-Familie	Plasma-Membran
At1g56070				×	<i>translation elongation factor 2-like protein</i>	Cu-Ionen Bindung, Chloroplast
At3g24430				×	MRP-ähnliches Protein	ATP Bindung, Chloroplast
At2g19730				×	Ribosomales Protein	Ribosom (strukturell)
At5g56710				×	Ribosomales Protein	Ribosom (strukturell)
At1g16720				×	<i>High Chlorophyll Fluorescence Phenotype 173</i>	Katalyt. Aktivität, Chloroplast
At4g18100				×	Ribosomales Protein	Ribosom (strukturell)
At2g33040				×	ATP Synthase Gamma-Kette	ATP-Synthese gekoppelter H ⁺ -Transport
At2g41840				×	Ribosomales Protein	Membran, Nukleolus
At1g04480				×	Ribosomales Protein	Ribosom (strukturell)

Die Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung der Proteinextrakte vor der Tandem-Affinitätschromatographie hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Signifikanz der identifizierten Proteine. Die große Untereinheit der RuBisCO (RBCL) konnte unabhängig von einer Vorfraktionierung in den TAP-Eluaten mit jeweils 6-7 Peptiden detektiert werden, obwohl die korrespondierende Proteinbande in der 1D-SDS-PAGE nach VF weniger intensiv angefärbt war (Proteinfärbungen Abbildung 3-14, Abbildung 3-19). Auch die Sequenzabdeckung des Proteins erreichte trotz Vorfraktionierung ähnliche Werte (-VF 14%, +VF 16%).

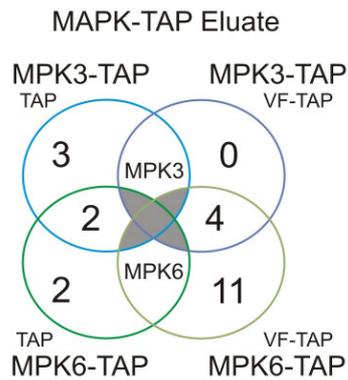


Abbildung 3-24 Verteilung der Protein-Identifizierungen aus der Tandem-Affinitätschromatographie

Verteilung der Protein-Identifizierungen aus der Tandem-Affinitätschromatographie von MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen mit und ohne Ammoniumsulfat-Vorfractionierung der Proteinextrakte.

Eine große Menge anderer Proteine konnte durch die Vorfractionierung der Proteinextrakte dezimiert werden. Neun der präsenten Proteine wurden zum Beispiel ausschließlich in den TAP-Eluaten ohne Vorfractionierung detektiert (Tabelle A-3). In anderen Fällen zog die VF eine reduzierte Anzahl detektierbarer Peptide nach sich. So reduzierten sich die identifizierten Peptide der Kontaminante At5g35630 (Glutamin Synthetase 2) von 10 auf 6 Peptide jeweils in allen drei Proben MPK3-TAP, MPK6-TAP und TAP.

Es gab jedoch auch Proteine, deren Sequenzabdeckung mit Hilfe der Vorfractionierung erhöht werden konnte. So auch für die Zielproteine dieser Arbeit. Die Sequenzabdeckung der MPK3 stieg um 12 auf 33%, die der MPK6 dagegen stieg nur marginal um 2 auf 11%. Zusätzlich konnten insgesamt 30 Proteine ausschließlich in TAP-Eluaten nach Ammoniumsulfat-Vorfractionierung detektiert werden. Die Abundanz einiger Proteine und damit die Identifizierungs-Wahrscheinlichkeit ihrer tryptischen Peptide konnte durch die Vorfractionierung erhöht werden.

3.3.2 Protein-Identifizierungen nach Strep-Affinitätschromatographie

Die StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde mit Gesamt-Proteinextrakten aus je 8 g 35S::MPK6-strepII und *mpk6* (Kontrolle) Pflanzenmaterial durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden wie bereits beschrieben für die *Shotgun*-Analyse vorbereitet (TCA-Präzipitation, Trypsin-Verdau, LC: ACN-Gradient 2-40% über 120 min, Triplikate).

Die MS-Daten wurden wiederum einzeln prozessiert und anschließend damit eine Datenbank-Suche (Datenbank: ATH_PROT basierend auf TAIR8) mit der MASCOT-Software durchgeführt. Die Ergebnisse wurden schließlich zusammen in das Programm Scaffold (Proteome-Software) geladen und ausgewertet.

Bei der Analyse der StrepII-Eluate konnten insgesamt 821 Spektren und 654 Peptide detektiert werden. Daraus leiten sich 143 Protein-Identifikationen ab, von denen 102 je in einer oder beiden Proben *mpk6*-Kontrolle und MPK6-strepII präsent waren (Abbildung 3-25).

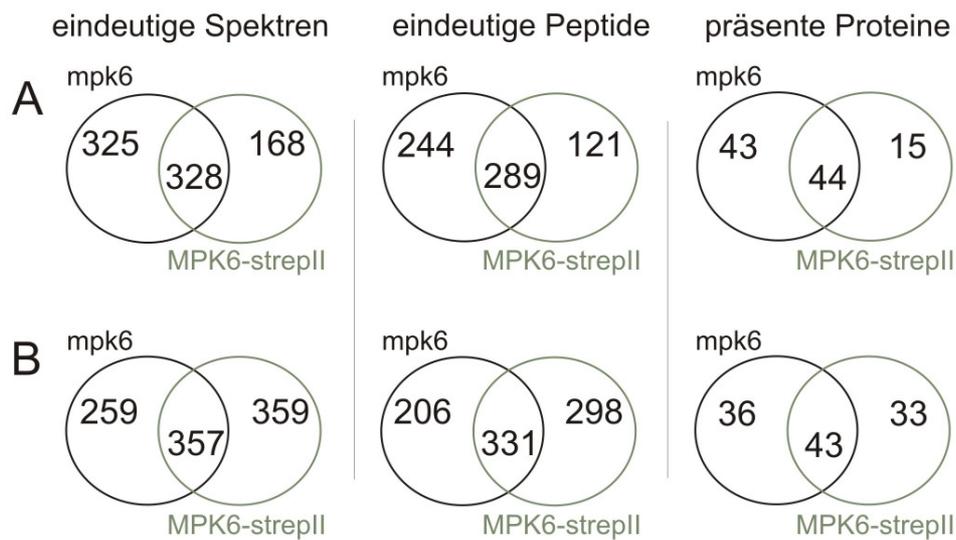


Abbildung 3-25 Protein-Identifizierungen aus der StrepII-Affinitätschromatographie. Unbehandelte (A) oder vorfraktionierte (B, 20% PEG-Überstand) Proteinextrakte aus je 8 g MPK6::MPK6-strepII und *mpk6* Pflanzenmaterial wurden mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt und die eluierten Proteine anschließend mit Trypsin verdaut. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine Nano-LC (ACN-Gradient 2-40%, 120 min) mit anschließender ESI-IT-MS/MS (Triplikate). Die Venn-Diagramme veranschaulichen die Verteilung der gesamten aufgenommenen eindeutigen Spektren sowie der eindeutig identifizierten Peptide. Die Protein-Identifizierungen geben die Anzahl der in je ein oder mehreren Proben präsenten Proteine an.

85% der insgesamt 102 Protein-Identifizierungen wurden in der Vektorkontrolle detektiert. 15 der in beiden Proben, *mpk6*-Kontrolle und MPK6-strepII, präsenten Protein-Identifizierungen waren spezifisch für die MPK6-strepII Pflanzen. Die MPK6 selbst war jedoch nach den verwendeten Ausschlusskriterien nicht präsent, sie wurde nur in einem der drei MS-Replikate detektiert und somit als nicht präsent gewertet. Die 15 Identifizierungen enthielten Proteine, die eine Rolle bei der Abwehrantwort nach Bakterienbefall (At4g32260), der Salz-induzierten Stressantwort (At1g56340) und der Translation (At2g40510) spielten. Die weiteren Proteine hatten Funktionen in der Fettsäure-Biosynthese, Protein-Faltung, der Antwort auf Schwermetall-Stress oder unbekannte Funktionen (Tabelle 3-4).

Einfluss der PEG-Vorfraktionierung auf die Protein-Identifizierungen

Die Analyse der StrepII-Eluat nach Vorfraktionierung (20% PEG) ergab 975 eindeutige Spektren und 835 Peptide. Diese konnten wiederum 170 Proteinen zugeordnet werden, von denen 112 Proteine in den Proben *mpk6*-Kontrolle und MPK6-strepII präsent waren (Abbildung 3-25).

Die Gesamt-Anzahl der identifizierten Proteine war im Vergleich zu den Eluaten ohne Vorfraktionierung etwa gleich, jedoch konnten auch bei der StrepTactin-Affinitätschromatographie mit Hilfe der Vorfraktionierung zusätzliche Proteine im Eluat detektiert werden. Zusätzlich wurde die Summe der abundanten und unspezifisch bindenden Proteine um acht auf 79 Proteine in der *mpk6*-Kontrolle reduziert.

Für die MPK6-strepII Probe konnten ungefähr doppelt so viele Proteine wie im Strep-Eluat ohne Vorfraktionierung identifiziert werden (Abbildung 3-25), einschließlich der MPK6 selbst mit einer Sequenzabdeckung von 12%. Auch im VF-strepII-Eluat identifizierte Proteine hatten eine Funktionen in der Abwehrantwort nach Bakterienbefall (At4g09650, At3g11630, At2g30860, At2g37660) sowie Salzstress (At1g04410, At1g07890, At2g36530, At5g09650, At1g53240, At3g52930). Weitere Proteine partizipierten in der zellulären Antwort auf Cadmium-Ionen oder hatten katalytische Aktivitäten (Tabelle 3-4). Etwa die Hälfte der Protein-Identifizierungen waren im Chloroplast lokalisiert.

Einige Proteine konnten sowohl ohne als auch mit PEG-Vorfraktionierung der Protein-extrakte nach der StrepTactin-Affinitätschromatographie identifiziert werden. So konnte das in der Abwehrantwort nach Bakterienbefall involvierte Protein At4g32260 in beiden Fällen identifiziert werden.

Tabelle 3-4 Protein-Identifizierungen aus der StrepII-Affinitätschromatographie

<i>AGI Code</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>-VF +VF</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion, zelluläre Lokalisation</i> <i>(GO Annotierung)</i>
At3g56130	×	Biotin/Lipoyl- <i>attachment</i> Domänen-enhaltendes Protein	Chloroplast
At4g32260	×	×	ATP Synthase Familie
At4g10480	×	Nascent-Polypeptid assoziiert	Bakterien-Abwehr, Chloroplast Unbekannt
At1g17880	×	NAC-Domänen Protein	Salz-Stressantwort
At3g01390	×	Untereinheit des vakuolären ATPase Complex	Plasma-Membran
At1g56340	×	Calreticulin CRT1	Salz-Stressantwort, Cd-Ionen Antwort
At1g48920	×	Nucleolin Protein	Nukleotid-Bindung, Nucleolus
At4g02510	×	Plastid Protein Import 2	Chloroplast
At1g73230	×	NAC-Domänen-Protein	Salz-Stressantwort
At5g15530	×	Biotin-Carboxyl Carrier Protein	Fettsäuresynthese
At2g40510	×	Ribosomales Protein	Translation, Ribosom
At3g49470	×	NACA2	unbekannt
At4g22670	×	HSP70-interagierendes Protein	Cd-Ionen Antwort
At3g16420	×	PYK10-bindendes Protein	Protein-Faltung, Zytosol
At1g07320	×	Ribosomales Protein	Chloroplast
At1g29910		×	Chlorophyll-bindendes Protein
At4g13940		×	Hydrolase
Atcg00270		×	PSII D2 Protein
Atcg00020		×	Chlorophyll-bindendes Protein
At2g43790		×	MPK6
At1g04410		×	Malat Dehydrogenase
At4g04640		×	ATP Synthase Untereinheit
At4g09650		×	ATPase Untereinheit
At1g07890		×	Ascorbat-Peroxidase APX1
At2g36530		×	Phosphopyruvat-Hydratase- Akt.
At3g11630		×	2 Cys-Peroxiredoxin
At2g30860		×	Glutathion-Transferase
At3g48730		×	Glutamat-Semialdehyd- aminomutase 2
At5g54770		×	Thiamin-biosynthetisches Gen
At2g37660		×	Koenzym-Bindung
At3g52880		×	Monodehydroascorbat-Redukt.
At2g43560		×	Immunophilin
At3g09820		×	Adenosin-Kinase 1
At5g09650		×	Inorg. Pyrophosphatase Akt.
At1g79550		×	Phosphoglycerat-Kinase
At5g36700		×	Phosphoglycolat-Phosphatase
At2g43750		×	O-Acetylserin(thiol)lyase Isoform
At1g53240		×	Malat Dehydrogenase
At4g14880		×	O-Acetylserin(thiol)lyase
At1g23740		×	Oxidoreduktase
At1g19570		×	Reduktase-Genfamilie
At3g52930		×	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase
At3g20390		×	Endoribonuklease-Familie Prot.
At3g58610		×	Ketolsäure-Reduktoisomerase
At2g47730		×	Glutathion-Transferase
At2g13360		×	Photorespiratorisches Enzym
At4g31990		×	Aspartat-Aminotransferase

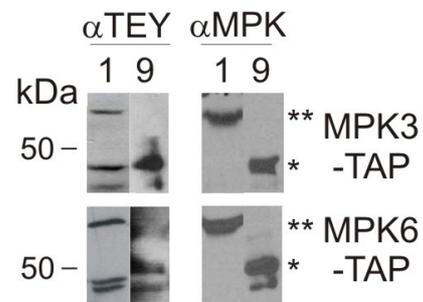
3.3.3 Protein-Identifizierungen nach Affinitätschromatographie flg22-elizitiertes Pflanzen

Zur Affinitätschromatographie wurde sowohl unbehandeltes als auch elizitiertes Pflanzenmaterial eingesetzt. Es ist denkbar, dass die Aktivierung der MAPK Kaskaden nach Flagellin-Perzeption die Stabilität der putativen Signaltransduktions-Komplexe beeinflusst. Eine aktive Signaltransduktion könnte die Interaktionen zwischen den Komponenten der MAPK Kaskaden stabilisieren, um eine schnelle Signaltransduktion zu gewährleisten.

Die Reinigung von Proteinkomplexen erfolgte dementsprechend auch aus flg22-elizitiertem Pflanzenmaterial. Dazu wurde die Tandem-Affinitätschromatographie mit Gesamt-Proteinextrakten aus je 90 g flg22-elizitiertem MPK3::MPK3-TAP, MPK6::MPK6-TAP und 35S::TAP (Vektorkontrolle) Pflanzenmaterial durchgeführt. Der Erfolg der Proteinreinigung wurde in einer Immuno-Detektion verfolgt. Die MPK3-TAP und MPK6-TAP Proteine aus flg22-elizitiertem (10 min) Pflanzenmaterial konnten erfolgreich im Rohextrakt und im TAP-Eluat detektiert werden (anti-MPK3 bzw. anti-MPK6 Antikörper, Abbildung 3-26). Außerdem konnte die Phosphorylierung der MPK3 und MPK6 sowohl im Extrakt als auch nach der Tandem-Affinitätschromatographie im Eluat mittels anti-TpEYp Antiserum detektiert werden (Abbildung 3-26 links).

Abbildung 3-26 Tandem-Affinitätschromatographie mit flg22-elizitierten MPK-TAP Pflanzen

MPK3::MPK3-TAP und MPK6::MPK6-TAP Pflanzen wurden 10 min mit dem flg22-Peptid elizitiert und mit den Proteinextrakten anschließend die Tandem-Affinitätsreinigung durchgeführt. Die Rohextrakte und die Eluate wurden mit 1D-SDS-PAGE analysiert. Die Immuno-Detektion erfolgte sowohl mit einem Antiserum, das spezifisch das phosphorylierte TEY-Motiv der beiden MAPK erkannte (α TEY, links), als auch mit anti-MPK3 bzw. anti-MPK6-Antiserum (rechts). Die Sterne markieren jeweils die MPK-TAP Proteine (**, MPK3-TAP 63 kDa bzw. MPK6-TAP 65 kDa) und das eluierte MPK-CBP (*, 48 bzw. 50 kDa) im finalen Eluat. (1, Gesamtproteinextrakt; 9, TAP-Eluat)



Die StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde entsprechend mit Gesamt-Proteinextrakten aus je 8 g flg22-elizitiertem 35S::MPK6-strepII und *mpk6* (Kontrolle) Pflanzenmaterial durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden anschließend wie bereits beschrieben weiterverarbeitet und analysiert (TCA-Präzipitation, Trypsin-Verdau, LC: ACN-Gradient 2-40% über 120 min, Triplikate). Die Protein-Identifizierungen erfolgten mit Hilfe von MASCOT und den Datenbanken ATH_PROT (basierend auf TAIR8) für die Strep-Eluate und die modifizierte Datenbank ATH_PROT_TAP (basierend auf TAIR7) für die TAP-Eluate.

Bei der *Shotgun*-Analyse der TAP-Eluate aus flg22-elizitierten Pflanzen konnten insgesamt 52 präsenzte Proteine identifiziert werden, von denen 44 (77%) in der TAP-Vektorkontrolle auftraten und damit als Kontaminanten bezeichnet wurden (Abbildung 3-27, Anhang Tabelle A-5).

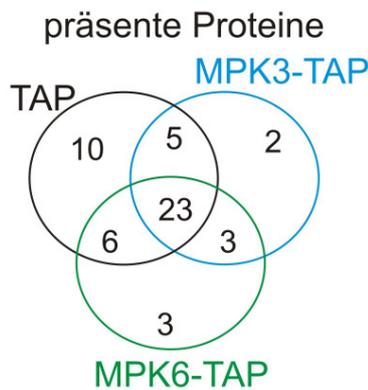


Abbildung 3-27 Protein-Identifizierungen aus der Tandem-Affinitätschromatographie von flg22-elizitierten Pflanzen

Flg22-elizitiertes Pflanzenmaterial (MPK3::MPK3-TAP, MPK6::MPK6-TAP und 35S::TAP, je 90 g) wurde extrahiert und die Tandem-Affinitätschromatographie durchgeführt. Eluierte Proteine wurden anschließend mit Trypsin verdaut. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine Nano-LC (ACN-Gradient 2-40%, 120 min) mit anschließender ESI-IT-MS/MS (Triplikate). Das Venn-Diagramm veranschaulicht die Verteilung der präsenten Protein-Identifizierungen auf die drei Proben TAP, MPK3-TAP und MPK6-TAP.

Tabelle 3-5 Identifizierte Proteine aus der Affinitätschromatographie von flg22-elizitierten TAP-Pflanzen

<i>AGI Code</i>	<i>MPK3-TAP flg22</i>	<i>MPK6-TAP flg22</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion, zelluläre Lokalisation (GO Annotierung)</i>
At3g43810	×	×	Calmodulin7	Ca-Ionen-Bindung
At3g45640	×		MPK3	Bakterien-Antwort, MAP Kinase-Aktivität
At1g20010	×	×	Beta-Tubulin, TUB5	Zytoskelett
At1g65960	×		Glutamat Decarboxylase, GAD2	
At5g27770	×	×	60S ribosomales Protein	Translation
At5g44340		×	Beta-Tubulin, TUB4	Zytoskelett
At2g43790		×	MPK6	Bakterien-Antwort, MAP Kinase-Aktivität
At3g27160		×	Glucose hypersensitiv 1	Translation

Etwa 20% der in den drei Proben präsenten Protein-Identifizierungen waren spezifisch für eine oder beide MAPK. In der Probe MPK3-TAP konnten die MPK3 (At3g45640) mit einer Sequenzabdeckung von 22% und die Glutamat Decarboxylase 2 (At1g65960, 17% SA) detektiert werden. In beiden Proben MPK3-TAP und MPK6-TAP konnten die Proteine Calmodulin 7 (At3g43810, Calcium-Bindung), Beta-Tubulin 5 (At1g20010, Zytoskelett) und ein 60S ribosomales Protein (At5g27770, Translation) mit je einer Sequenzabdeckung von circa 11%, 6% und 20% detektiert werden. Spezifische Identifizierungen in der MPK6-TAP Probe waren die MPK6 selbst (At2g43790, SA 6,5%), ein Zytoskelett-Bestandteil (Beta-Tubulin 4, SA 6,5%) und das ribosomale Protein Glucose-hypersensitiv 1 (At3g27160, SA 13%), das in der Translation eine Rolle spielt (Tabelle 3-5).

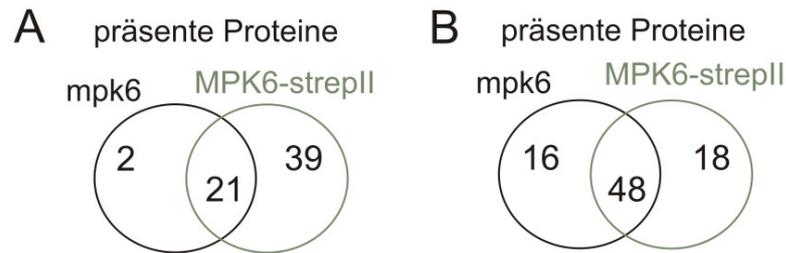


Abbildung 3-28 Protein-Identifizierungen aus StrepII-Affinitätschromatographie von flg22-elizitierten Pflanzen. Unbehandelte (A) oder vorfraktionierte (B, 20% PEG-Überstand) Proteinextrakte aus je 8 g MPK6::MPK6-strepII und *mpk6* Pflanzenmaterial wurden mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt und die eluierten Proteine anschließend mit Trypsin verdaut. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine 1D-nano-LC (ACN-Gradient 2-40%, 120 min) mit anschließender ESI-IT-MS/MS (Triplikate). Die Venn-Diagramme veranschaulichen die Verteilung der präsenten Protein-Identifizierungen auf die drei Proben *mpk6*-Kontrolle und MPK6-strepII.

Bei der Analyse der StrepII-Eluate aus flg22-elizitiertem Pflanzenmaterial konnten insgesamt 62 (Strep) bzw. 82 (VF-Strep) Proteine identifiziert werden (Abbildung 3-28).

In den MPK6-strepII Pflanzen wurden neben der MPK6 mit einer Sequenzabdeckung von 16% (-VF) bzw. 20% (+VF) eine große Zahl weiterer Proteine identifiziert. Dazu zählten Proteine mit Funktionen in der Abwehrantwort nach Bakterienbefall sowie Salzstress. Weitere Protein-Identifizierungen hatten Funktionen in der Nukleotid-Bindung, in der Reaktion auf Cadmium-Ionen, der Translation und andere Funktionen (Tabelle 3-6). Die identifizierten Proteine waren zu einem großen Anteil im Chloroplasten oder Nukleosom lokalisiert.

Einige Proteine konnten in den MPK6-strepII Proben mit PEG-Vorfraktionierung unabhängig von der flg22-Elizitierung identifiziert werden: S-Adenosyl-l-Homocystein Hydrolase (At4g13940), Fruktose-Bisphosphat-Aldolase (At3g52930) und Malat-Dehydrogenase (At1g04410).

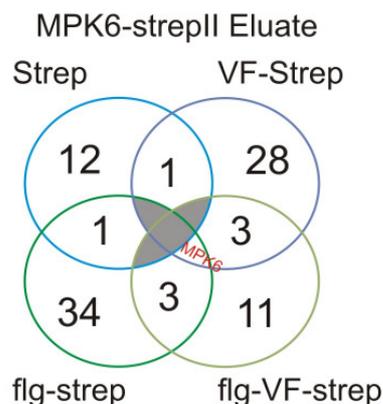


Abbildung 3-29 Verteilung der Protein-Identifizierungen aus der Strep-Affinitätschromatographie

Verteilung der Protein-Identifizierungen aus der Strep-Affinitätschromatographie von 35S::MPK6-strepII Pflanzen mit und ohne PEG-Vorfraktionierung der Proteinextrakte. Die MPK6 selbst konnte nicht im Strep-Eluat detektiert werden, jedoch in allen anderen Eluaten.

Tabelle 3-6 Identifizierte Proteine aus der Affinitätschromatographie von flg22-elizitierten strepII-Pflanzen

AGI Code	MPK6-strepII		Name	Funktion, zelluläre Lokalisation (GO Annotierung)
	flg22 -VF	+VF		
At4g20360	×		GTPase Homolog	GTP-Bindung, Chloroplast Stroma
At2g43790	×	×	MPK6	Bakterien-Antwort, MAP Kinase-Aktivität
At5g02500	×	×	Heat shock cognate protein 70-1	Cd-Ionen-Antwort, ATP-Bindung
At5g47210	×		RNA-bindendes Protein	Plasma-Membran
Atcg00280	×		Untereinheit des PSII Reaktionszentrums	Chloroplast Thylakoid
At4g39260	×		Glycin-reiches Protein 8	Salz-Stressantwort, Zellwand
At1g07920	×		EF-1alpha	Cd-Ionen-Antwort, Chloroplast
At3g53460	×	×	RNA-bindendes Protein	Chloroplast Stroma
At5g26742	×		<i>Embryo defective</i> 1138	ATP-Bindung, Chloroplast Stroma
At1g68560	×		Alpha-Xylosidase 1	Zellwand
At1g27090	×		Glycin-reiches Protein	unbekannt
At3g11510	×		40S ribosomales Protein	Nukleolus, zytosolisches Ribosom
At3g47070	×		unbekannt	Chloroplast Thylakoid
At3g45980	×		Histon H2B	Nukleosom Assemblierung, Nukleolus
At5g02530	×		RNA-bindendes Protein	Nukleotid-Bindung
At5g52470	×		Fibrillarin 1	Membran, Nukleolus
At3g46780	×		Plastid transkriptionell aktiv	Metabolismus, Chloroplast, Membran
At1g21500	×		Phosphatidylinositol-Phosphat-Kinase	
At1g29250	×		nukleinsäure-bindend	Nukleinsäure-Bindung, Nukleolus
At5g59950	×		RNA bindendes Protein	Nukleinsäure-Bindung, Chloroplast
At1g26110	×		unbekannt	
At2g40510	×		Ribosomales Protein	Translation, Ribosom
At4g17520	×			Peroxisom
At1g52000	×		Jacalin Lectin-Familien Protein	
At4g31700	×		Putatives ribosomales Protein	Chloroplast, Membran
At3g14310	×		Pektin Methylesterase 3	Plasma-Membran, Apoplast
At3g53430	×		60S ribosomales Protein	Translation, Ribosom
At4g16830	×		Nuklear-RNA-bindendes Protein	
At1g78830	×		Lectin Familie ähnlich	Zucker-Bindung, Zellwand
At1g08880	×		Histon H2A Protein	Nukleosom-Assemblierung
At3g26420	×		Zinkfinger-enthaltendes Glycin-reiches RNA-bindendes Protein	
At3g53020	×		Ribosomales Protein	Ribosom (strukturell)
At2g04520	×		Translations-Initiierungs-Faktor	Translations-Initiierung
At1g03090	×		MCCA	Mitochondrium, zytosolisches Ribosom
At2g34040	×		apoptose-inhibitorisch 5	Bindung
At4g34670	×		Ribosomales Protein	Zellwand, Membran
At5g27770	×		Ribosomales Protein	Translation, Ribosom
At3g05560	×		Ribosomales Protein	Translation, Nukleolus
At2g42520	×		Helikase	ATP-Bindung, Peroxisom
At5g17920		×	Methionin-Synthase	Salz-Stressantwort
Atcg00470		×	ATP Synthase Kette	Chloroplast Thylakoid
At4g13940		×	S-Adenosyl-l-Homocystein Hydrolase	Plasma-Membran
At2g42530		×	kälterereguliert 15B	Chloroplast Stroma
At5g09810		×	Actin	Zellwand

Tabelle 3-7 (Fortsetzung)

AGI Code	MPK6-strepII		Name	Funktion, zelluläre Lokalisation (GO Annotierung)
	flg22	-VF +VF		
At2g05070	×		LH ChlorophyllB-bindend 2	Photosynthese
At3g54890	×		LHCA1	Chloroplast
At3g04790	×		Ribose-Phosphat-Isomerase	Bakterien-Abwehr
At1g43670	×		Fructose-Bisphosphatase	Carbohydrat-Metabolismus
At1g35720	×		Annexin Arabidopsis 1	Cd-Ionen-Antwort, ATP-Bindung
At5g17710	×		<i>Embryo defective</i> 1241	Protein-Bindung
At2g21330	×		Fructose-Bisphosphat-Aldolase	Cd-Ionen Antwort
At4g03280	×		Rieske Eisen-Schwefel Domäne	Bakterien-Abwehr
At3g52930	×		Fructose-Bisphosphat-Aldolase	Salz-Stressantwort
At1g04410	×		Malat-Dehydrogenase	Salz-Stressantwort

3.3.4 Vergleich der Protein-Identifizierungen

Ein Viertel der insgesamt 25 in den MPK3-TAP- und MPK6-TAP-Eluaten identifizierten Proteine traten in beiden MAPK Proben auf (Abbildung 3-24). Darunter befand sich auch ein Protein mit einer putativen Funktion in der Pathogen-Abwehr (Phosphoribulo-Kinase, Tabelle 3-3), die nur in den entsprechenden VF-TAP-Eluat detektiert wurde. Solche gemeinsamen Protein-Identifizierungen waren zu erwarten, da beide MAPK redundante Funktionen in Arabidopsis übernehmen können.

Insgesamt gab es vier ko-eluierte Proteine, die sowohl in MPK6-TAP- als auch in MPK6-Strep-Eluaten identifiziert werden konnten (Abbildung 3-30). Das ribosomale Protein At5g27770 trat in allen flg-Eluaten auf (MPK3-TAP, MPK6-TAP, MPK6-strep), die beiden anderen ko-eluierten Proteine (Methionin-Synthase, Actin) erschienen jeweils im VF-MPK6-TAP- und flg-VF-MPK6-Strep-Eluat.

Die Analyse von flagellin-elizitiertem Material führte zur Identifizierung weiterer ko-eluierter Proteine, jedoch gab es keine gemeinsamen Protein-Identifizierungen in den TAP- und flg-TAP-Eluaten bis auf die MPK3 bzw. MPK6 selbst (Abbildung 3-30). Bei den Strep-Eluaten konnten neben der MPK6 auch drei metabolische Proteine unabhängig von einer flg-Elizitierung identifiziert werden. Bis auf zwei Proteine mit einer Funktion in der Bakterien-Abwehr waren jedoch keine auffälligen ko-eluierten Proteine in allen flg-Eluaten detektiert worden. Da diese beiden Identifizierungen chloroplastidär lokalisiert waren ist auch eine Interaktion mit den zellulär durch Zellmembranen separierten MAPK unwahrscheinlich.

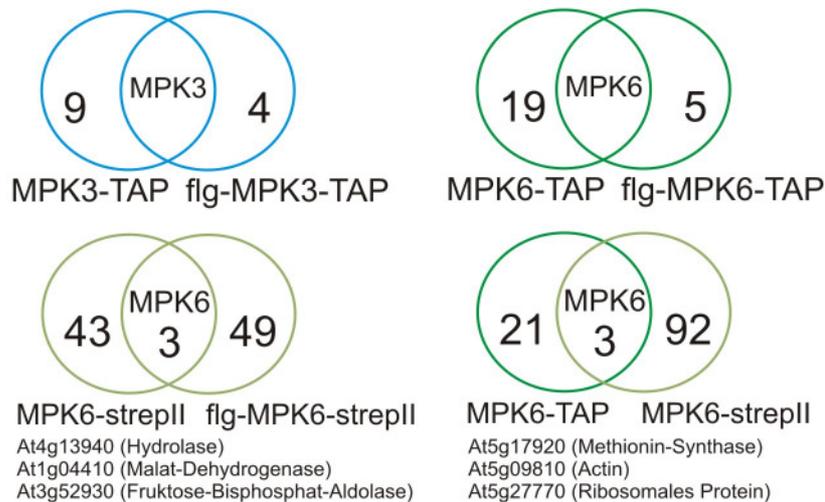


Abbildung 3-30 Vergleich der Protein-Identifizierungen aus LC-MS/MS Messungen
Vergleich der Protein-Identifizierungen in Abhängigkeit vom Einsatz flg-elizitierten Materials (flg-Eluate) sowie Vergleich der Protein-Identifizierungen der MPK6-TAP- und MPK6-Strep-Eluate (einschließlich VF-Eluate).

Beide Strategien, TAP- und StrepII-Affinitätschromatographie, resultierten in einem sich nur teilweise überlappenden Set an in den Kontrollen detektierten Hintergrundproteinen. Trotzdem glich sich die Zusammensetzung der nach beiden Strategien identifizierten Proteine. Eine vergleichende Analyse der GO (*gene ontology*) Einordnung der identifizierten Proteine nach ihren Funktionen in biologischen Prozessen ergab, dass etwa ein Viertel in die Antwort auf Stress sowie biotische und abiotische Stimuli und ein Viertel in metabolische Prozesse involviert war (Abbildung A-2, Abbildung A-3). Nach der GO Annotierung der molekularen Funktionen hatte ein Hauptteil der Proteine struktur-gebende Aktivitäten und Bindungs-Funktionen. Die Hälfte der Identifizierungen waren nach der vergleichenden Analyse im Chloroplast, dem Zytoplasma und Membranen lokalisiert worden (Abbildung A-2, Abbildung A-3). Es besteht also die Chance, dass die in beiden Strategien in den Proben detektierten Proteine aufgrund ihrer Assoziation mit der MPK6 angereichert wurden. Sie könnten weiterhin erste Indizien für eine Funktion der MPK6 im Metabolismus, beim Zytoskelett oder in der Translation sein.

3.4 Erste Analysen ko-gereinigter Proteine als putative MAPK-Interaktoren

Um parallel mehrere ko-gereinigte Proteine auf ihre Assoziation mit MPK3 und MPK6 *in vivo* testen zu können und damit ihre Interaktion zu validieren, wurde die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) angewendet (siehe Abschnitt 3.1.1). Die ersten Analysen erfolgten mit den Protein-Identifizierungen aus der 1D-SDS-PAGE-MS Analyse, da diese zeitlich als erste zu Verfügung standen.

Die entsprechenden cDNA Sequenzen der identifizierten Proteine wurden mit der Gateway-Technologie in D-TOPO/pENTR-Vektoren kloniert. Nach einer Sequenzierung der Gene wurden diese in Vektoren, die für eine BiFC-Analyse geeignet sind, transferiert. So konnten die Kandidaten-Gene Transkriptionsfaktor der B3-Familie, Rezeptor-Lectin-Kinase und PBS1 erfolgreich kloniert werden.

Die MPK3 und MPK6 wurden mit dem N-terminalen Teil des YFP und entsprechende Kandidaten-Gene mit dem C-Terminus des YFP fusioniert. Die Fusionsproteine wurden anschließend zusammen mit CFP als Transfektionskontrolle in drei Replikaten transient in *Arabidopsis thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Die mikroskopischen Analysen und die Auswertung erfolgten wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Einige Beispiele der mikroskopischen Aufnahmen sind im Anhang (Abbildung A-1) dargestellt. Die Transfektionseffizienz lag zwischen 10 und 30%. Im Diagramm (Abbildung 3-31) ist der prozentuale Anteil der YFP-fluoreszierenden Protoplasten (gelb) an den insgesamt transfizierten Protoplasten (blau) dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Daten wurden auf ihre Normalverteilung hin getestet und mittels einer ANOVA-Analyse in Signifikanzklassen (Anhang Tabelle A-1) eingeteilt. Dabei entsprach die Gruppe A der Positiv-Kontrolle, die Klasse E stellte den Fall dar, dass nur ein sehr niedriger Anteil an YFP-Fluoreszenz unter den Protoplasten detektierbar war (Negativkontrolle). Die Mischklasse DE war intermediär, sie kann weder der Signifikanzklasse D noch der Klasse E eindeutig zugeordnet werden.

Der Anteil der YFP-fluoreszierenden Protoplasten nach der Ko-Transfektion von MPK6 mit den putativen Interaktoren Transkriptionsfaktor der B3-Familie (At4g31660) und Rezeptor-Lectin-Kinase (At2g37710) wurde in die Klasse E eingeordnet, in der auch die Vektor-Kontrollen akkumulierten. Gleichmaßen wurde die Expression des Transkriptionsfaktors der B3-Familie mit der MPK3 in diese Signifikanzklasse eingeordnet.

Die Interaktionen zwischen MPK3 und der Rezeptor-Lectin-Kinase (At2g37710) sowie zwischen MPK6 und PBS1 wurden in die intermediäre Signifikanzklasse DE eingeordnet. Sie unterscheidet sich signifikant von den Negativ-Kontrollen aber entspricht auch nicht der Klasse D. In diese Signifikanzklasse wurden schon die Protein-Partner MPK3-TAP und VIP1 bzw. MPK4-TAP und PRP eingeordnet. Auch die Interaktion zwischen MPK3 und PBS1 wurde in diese Klasse eingeordnet (vgl. Tabelle A-1), hier zeigten 26% der transformierten Protoplasten eine YFP-Fluoreszenz (Abbildung 3-31, Abbildung A-1). Es gibt somit erste Hinweise auf eine aktive Interaktion zwischen MPK3 und PBS1.

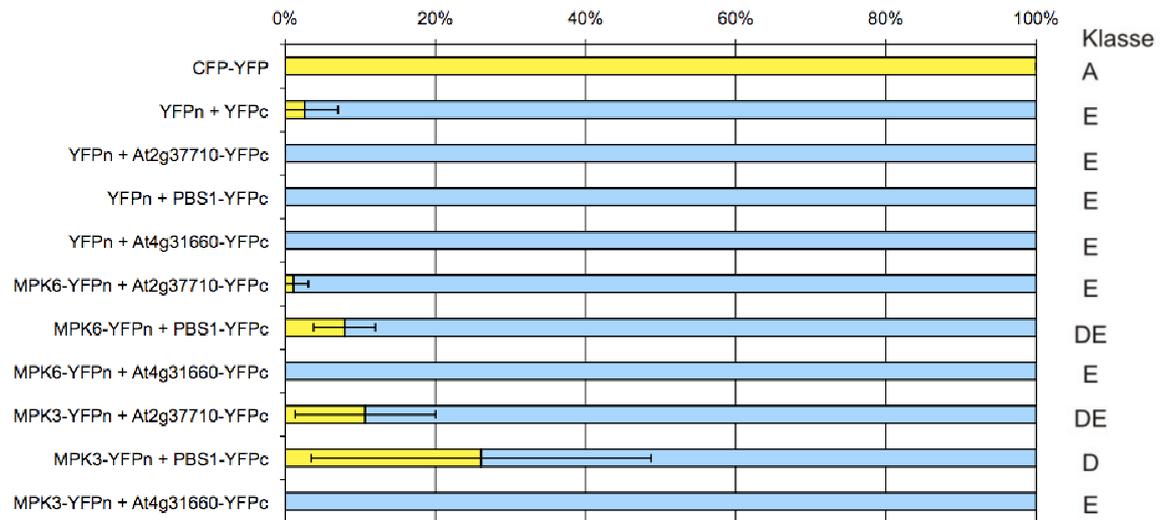


Abbildung 3-31 BiFC-Analyse der putativen Interaktoren (Diagramm)

Übersicht der Analyse der Interaktion zwischen MPK3- bzw. MPK6-YFP^N und den putativen Substraten (YFP^C) aus den Proteinkomplex-Anreicherungen. Als Kontrolle wurde der leere Vektor (YFP^N) jeweils mit den putativen Substraten ko-exprimiert. (Beschreibung siehe Abbildung 3-9)

PBS1 (*avrPphB* suszeptibel 1) ist in die Abwehrantwort gegen Bakterien involviert. Die mRNA wird ubiquitär in allen Pflanzenorganen exprimiert (Genevestigator), das Protein konnte jedoch nur in Total-Proteinextrakten aus Arabidopsis Zellkulturmaterial in einer Proteomics-Analyse detektiert werden (AtProteome Datenbank: <http://fgcz-atproteome.unizh.ch/index.ph>).

Das *PBS1*-Gen kodiert für eine putative Serin/Threonin-Kinase. Sie gehört zu einer Protein-kinase-Unterfamilie, die keine weiteren Mitglieder mit bekannten Funktionen enthält (Swiderski und Innes 2001). Zusammen mit RPS5 ist sie in Arabidopsis verantwortlich für die spezifische Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* Stämme, die das Avirulenzgen *avrPphB* tragen (Swiderski und Innes 2001). Dabei stellt PBS1 das spezifische Substrat der bakteriellen Cystein-Protease AvrPphB dar (Zhu *et al.* 2004, Shao *et al.* 2003). Diese spaltet PBS1, was zu einer Aufhebung der Autoinhibierung von RPS5, einem Mitglied der NB-LRR Familie pflanzlicher Resistenzgene, und zu einer Abwehrantwort in Form des programmierten Zelltods führt (Ade *et al.* 2007). Dabei ist die Spaltung unabhängig von RPS5, aber nicht ausreichend zur Induktion einer Abwehrantwort in Abwesenheit von RPS5 (Shao *et al.* 2003). RPS5 agiert also als R-Protein, das das AvrPphB-Genprodukt indirekt über seine Aktivität erkennt (Shao *et al.* 2003).

Zusätzliche Hinweise der Interaktion von PBS1 mit MPK3 und/oder MPK6 sollten aus weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten validiert werden, wie Ko-IP oder FRET-Analysen. Mittels Kinase Assay könnte überprüft werden, ob PBS1 ein MAPK Substrat ist und von MPK3 oder MPK6 phosphoryliert werden kann. Zumindest existiert in der PBS1 Amino-

säure-Sequenz C-terminal eine putative Phosphorylierungsstelle für MAPK (Serin/Prolin). Weiterhin sollten Untersuchungen der *Knockout* und Überexpressions-Mutanten erfolgen, um eine mögliche Rolle der MAPK in der PBS1-PRS5-abhängigen Gen-für-Gen Resistenz zu validieren.

4. Diskussion

Die meisten physiologischen Prozesse werden über Protein-Interaktionen vermittelt (Alberts 1998). Auch die in Eukaryoten ubiquitär konservierte MAPK Signaltransduktion erfolgt über Multi-Proteinkomplexe, die in Hefen und dem humanen System u.a. mit Hilfe von Gerüstproteinen organisiert werden (Andersson *et al.* 2004, Park *et al.* 2003, Shaw und Filbert 2009). Auch im pflanzlichen System wird die Existenz von komplexen Proteinstrukturen sowie deren Organisation über Gerüstproteine in der MAPK Signaltransduktion angenommen (vgl. 1.3.1). Zur Identifizierung neuer und unbekannter Komponenten von MAPK Kaskaden aus *Arabidopsis thaliana* kamen bereits verschiedene Verfahren erfolgreich zur Anwendung. Protein-Arrays ergaben dokumentierte sowie eine Reihe neuer putativer MAPK Interaktoren (Feilner *et al.* 2005, Popescu *et al.* 2009), deren Validierung zum Teil noch nicht abgeschlossen ist. Kürzlich wurde ein neues MPK6 Substrat publiziert, dass in einer Hefe-Zwei-Hybrid Studie detektiert wurde (Bethke *et al.* 2009). Diese Methoden erlauben jedoch nur die Identifizierung bivalenter Proteininteraktionen *in vitro*. Eine Identifizierung von komplexen Proteinstrukturen einschließlich eventueller Gerüstproteine ist mit diesen Methoden nicht möglich. Auch können aufgrund der großen strukturellen Diversität Sequenz-Homologien nicht speziessübergreifend zur Identifizierung neuer pflanzenspezifischer, funktionell analoger Proteine genutzt werden. Die Identifizierung weiterer MAPK Kaskade-Komponenten und Gerüstproteine aus *Arabidopsis thaliana* sollte also mittels biochemischer Interaktionsstudien erreicht werden können.

4.1 Isolierung von Proteinkomplexen aus *Arabidopsis thaliana* durch Affinitäts-Chromatographie

Eine Möglichkeit, auch multivalente Proteininteraktionen zu analysieren besteht in der Affinitätschromatographie von Proteinkomplexen. Diese *in vivo* Methode ermöglicht die chromatographische Anreicherung intakter Komplexe inklusive nicht-proteinogener Komponenten wie Ko-Faktoren oder Nukleinsäuren, die für die Stabilität essentiell sein können und hat damit Vorteile gegenüber *in vitro* Methoden wie dem Protein-Array oder dem Hefe-Zwei-Hybrid System. Zusätzlich kann die chromatographische Protein-Anreicherung in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung unbekannter MAPK Interaktionspartner erhöhen (Gingras *et al.* 2007, Kaiser *et al.* 2008, Lalonde *et al.* 2008, Terpe 2003, Yang *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb verschiedene methodische Ansätze zur Analyse von MAPK Komplexen und Identifizierung neuer MAPK

Interaktoren aus *Arabidopsis thaliana* kombiniert (Abbildung 4-1). Hauptaugenmerk lag dabei auf der Affinitäts-Chromatographie der drei flg22-responsiven MPK3, MPK4 und MPK6.

Der Versuch einer Isolierung von MAPK Proteinkomplexen erfolgte über den TAP- (*Tandem Affinity Purification*, Rigaut *et al.* 1999) und den StrepII-Epitoptag (Witte *et al.* 2004), da mit diesen beiden Strategien bereits erfolgreich Proteinkomplexe isoliert und identifiziert werden konnten. So wurde die TAP-Strategie erfolgreich für die Anreicherung von höhermolekularen Proteinassamblaten aus verschiedenen Systemen angewendet, darunter sind Humanzellen (Benzinger *et al.* 2005, Bürckstümmer *et al.* 2006), Hefen (Gavin *et al.* 2006, Krogan *et al.* 2006, Shevchenko *et al.* 2002) und Drosophila (Veraksa *et al.* 2005). Im pflanzlichen Organismus fand die Tandemaffinitäts-Chromatographie bereits Anwendung in Reis (Abe *et al.* 2008, Rohila *et al.* 2006) und Arabidopsis (Rohila *et al.* 2004; Van Aken *et al.* 2007; Van Leene *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2008).

Die StrepII-Affinitätschromatographie wurde ursprünglich zur Reinigung rekombinanter Proteine entwickelt (Skerra *et al.* 2000), wurde aber auch schon erfolgreich zur Analyse von Arabidopsis Proteinkomplexen eingesetzt (Witte *et al.* 2004). Auch Werner und Kollegen konnten ein am C-Terminus StrepII-fusioniertes Protein erfolgreich aus Pflanzen isolieren. Sie erhielten dabei eine hohe Reinheit und hoben die Schnelligkeit des Protokolls besonders hervor (Werner *et al.* 2008).

Schließlich bieten beide Verfahren – TAP und StrepII - einige Vorteile: die Anreicherung der Proteinkomplexe erfolgt unter nativen Bedingungen. Der TAP-Tag ist zwar mit 20 kDa sehr groß (im Fall der fusionierten MAPK macht er circa 30% des Proteins aus), die Zwei-Schritt-Strategie bietet aber den Vorteil einer größeren Reduktion abundant bindender Proteine (Rigaut *et al.* 1999). Der StrepII-Tag besteht dagegen aus einem kurzen Oktapeptid, der eine schnell durchführbare Ein-Schritt-Chromatographie ermöglicht (Witte *et al.* 2004). Dieser Umstand kann sich positiv auf die Ausbeute an Proteinkomplexen auswirken, vor allem wenn diese eher kurzlebig sind. Jedoch könnte auch die Verunreinigung mit unspezifisch bindenden Proteine höher sein als bei einer Zwei-Schritt-Strategie.

Beide Epitop-Tags hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Funktionalität fusionierter Proteine. Sowohl TAP-markierte als auch ein StrepII-markiertes Protein konnten Mutanten-Phänotypen erfolgreich komplementieren (Batelli *et al.* 2007, Gao *et al.* 2003, Werner *et al.* 2008). Die transiente Expression von dem Protein Cf-9:TAP konnte eine Avr9-abhängige HR in *Nicotiana benthamiana* induzieren (Rivas *et al.* 2002), das TAP-markierte Protein war also funktional. Da der Einfluss des Epitop-Tags auf die Funktionalität je nach fusioniertem

Protein variieren könnte, erfolgten in dieser Arbeit auch Funktionsanalysen mit den verwendeten MAPK-Fusionsproteinen.

Eine Übersicht der durchgeführten Experimente soll Abbildung 4-1 geben. Als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie standen verschiedene stabile Pflanzen- und Zellkultur-Transformanten von *Arabidopsis thaliana* zur Verfügung (Abschnitt 3.1.2). Diese wurden entsprechend der Eignung als Ausgangsmaterial für die Affinitäts-Chromatographie analysiert. Weiterhin erfolgten Analysen zur Stabilisierung der MAPK Komplexe mittels chemischer Quervernetzer und zur Abreicherung abundanter Proteine aus Pflanzenextrakten mit verschiedenen Vorfraktionierungs-Methoden (Abbildung 4-1).

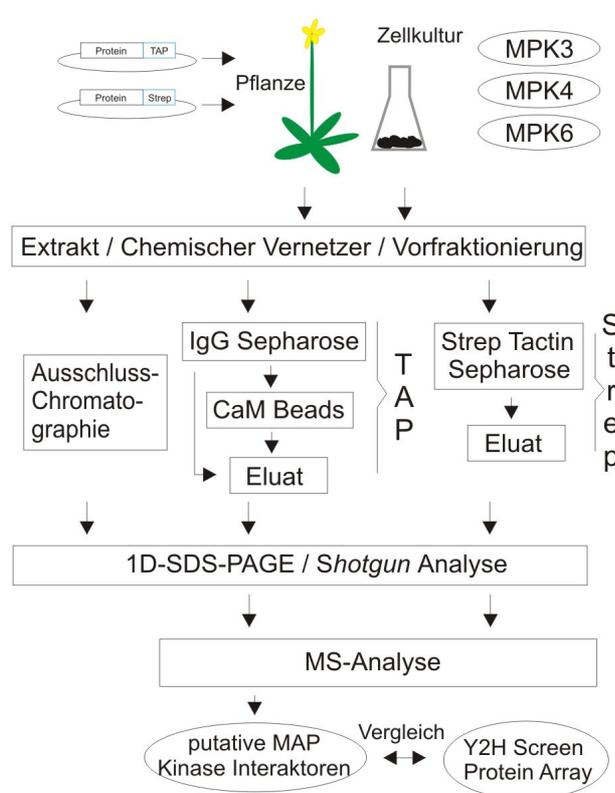


Abbildung 4-1 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Strategien zur Identifizierung von MAPK Proteinkomplexen

Die Extraktion der Proteinkomplexe erfolgte aus stabilen Pflanzen- und Zellkultur-Transformanten. Anschließend erfolgten Funktionsanalysen der Fusions-Proteine. MAPK Proteinkomplexe wurden mittels nativer PAGE und Ausschluss-Chromatographie untersucht. Die Möglichkeit der Stabilisierung der Proteinkomplexe wurde durch Zugabe von chemischen Quervernetzern oder verschiedenen Vorfraktionierungs-Methoden analysiert. Die Affinitäts-Chromatographie-Ansätze wurden optimiert. Eluierte Proteine sollten mittels Massenspektrometrie identifiziert und anschließend funktional charakterisiert werden.

Da *Arabidopsis* Zellsuspensionskulturen bereits erfolgreich als Ausgangsmaterial zur Analyse des Zellzyklus-Interaktoms genutzt werden konnten (Van Leene *et al.* 2007, 2008, Van Aken *et al.* 2007, Xing *et al.* 2008), wurden zu Beginn der Arbeiten stabile Zellkultur-Transformanten untersucht (vgl. 3.1.1). Ein weiterer Vorteil daran war die stärkere Inkorporation der MPK3 und MPK6 Proteine in Proteinkomplexe im Vergleich zu pflanzlichen Proteinextrakten (Schlichting 2007), die auf die unterschiedliche Physiologie beider Systeme zurückzuführen sein könnte. So sind *Arabidopsis* Zellkulturen im Gegensatz zu Pflanzen nicht photosynthetisch aktiv. Schließlich ist auch die Generierung von Zellmaterial sowie die Applikation

des Elizitor-Peptids flg22 schnell und einfach durchzuführen, was einen weiteren Vorteil gegenüber Pflanzen ausmacht.

Die selektierten transgenen Zellkulturen MPK3::MPK3-TAP, 35S::MPK3-TAP (Überexpression) und die Vektorkontrolle 35S::TAP (R. Schlichting) konnten jedoch aufgrund der Resultate nach deren Charakterisierung nicht als Ausgangsmaterial für eine Protein-Chromatographie eingesetzt werden. Deshalb wurden nachfolgend nur Rosettenblätter von stabilen Pflanzentransformanten als Ausgangsmaterial für die Affinitäts-Chromatographie eingesetzt (Tabelle 3-1). Die Expression der MPK3-TAP und MPK6-TAP Proteine erfolgte in stabilen Pflanzen-Transformanten im jeweiligen MAPK-*Knockout* Hintergrund um die Konkurrenz der natürlichen MAPK zu vermeiden.

4.1.1 Funktionalität der MPK3-/MPK6-TAP und MPK6-strepII Proteine

Da das Vorhandensein eines Epitop-Tags Auswirkungen auf die Funktionalität, Aktivität und zelluläre Lokalisation eines Proteins haben kann (Bauer und Kuster 2003), wurden die fusionierten MAPK entsprechend analysiert. Die Funktionalität der MPK3-TAP, MPK6-TAP und MPK6-strepII Proteine wurde durch die Epitop-Tags nicht negativ beeinflusst. Die MPK3-TAP, MPK6-TAP und MPK6-strepII Proteine waren nach einer flg22-Elizitierung aktiviert (TpEYp Immuno-Detektion) und konnten erfolgreich ein artifizielles Substrat phosphorylieren (Kinase-Assay, Schlichting 2007, Spielau 2004).

Der TAP-Tag scheint weiterhin keinen negativen Einfluss auf die 3D-Struktur zu haben. Weder die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen noch die Integration in höhermolekulare Proteinkomplexe war beeinträchtigt. Alle Epitop-markierten Proteine - MPK3-TAP, MPK4-TAP und MPK6-TAP – interagierten *in vivo* mit ihren jeweiligen Substraten VIP1 (MPK3) und NDPK2 (MPK6) sowie dem Prolin-reichen Protein (MPK3, MPK4, MPK6) (BiFC Analysen).

In Gelpermeations-Chromatographie-Analysen konnte eine Verteilung der MPK3-TAP und MPK6-TAP auf Monomere und höhermolekulare Fraktionen beobachtet werden (Abbildung 3-7). Dabei hatte auch die Ammoniumsulfat-Präzipitation der MAPK-TAP Komplexe keinen detektierbaren Einfluss auf deren Integrität (Abbildung 3-13). Das Verfahren der nativen Gelpermeations-Chromatographie wurde auch bei Van Leene und Kollegen zur Analyse von Protein-Komplexen angewendet (Van Leene *et al.* 2007) und führte bereits zu Hinweisen auf die Existenz höhermolekularer präformierter MPK3 und MPK6 Komplexe in Pflanzen- und Zellkulturextrakten (Schlichting 2007).

Mit Hilfe der durchgeführten Vernetzungs-Analysen konnten weitere Hinweise auf präformierte MAPK Proteinkomplexe erhalten werden. Nach Zugabe des chemischen Vernetzers DTSSP zu MPK3-TAP Proteinextrakten konnten zusätzliche Signale der MPK3-TAP in Fraktionen in einem MG-Bereich von 600 bis 900 kDa detektiert werden (Abbildung 3-17). Diese Signale waren in nicht-vernetzten Proteinextrakten bei gleicher Mengenbelastung nicht vorhanden.

Die Detektion der MAPK Komplexe in MPK6-strepII Proteinextrakten war nicht erfolgreich, da in Gelfiltrations-Analysen fast ausschließlich Monomere detektiert werden konnten. Trotzdem konnten Mueller und Kollegen bei Analysen der 3D-Struktur eines kleinen StrepII-Fusionsproteins keine Konformations-Änderungen des Köderproteins detektieren (Mueller *et al.* 2003). Ein His6-StrepII-Fusionsprotein mit einer aus Hähnchen stammenden SH3 Domäne, in dem die Affinitäts-Tags 27% der Gesamt-Proteinsequenz darstellten, hatte sehr ähnliche bio-physikalische Eigenschaften wie die nicht-markierte SH3 Domäne. Die Kristallisation ergab im Vergleich kaum Unterschiede in der 3D-Struktur des markierten und unmarkierten Proteins (Mueller *et al.* 2003). Tada und Kollegen konnten zeigen, dass das Protein NPR1-TAP ebenso wie das Wildtyp-Protein NPR1 fähig war Oligomere auszubilden (Tada *et al.* 2008). Aufgrund dessen wurde auch für die MPK6-strep Proteine angenommen, dass der Strep-Tag keinen negativen Einfluss auf die 3D-Struktur hatte. Es könnte sein, dass die Proteinkomplexe im Strep-Extraktionspuffer instabiler oder kurzlebiger waren als im TAP-Extraktionspuffer, da das Extraktionsmilieu einen großen Einfluss auf die Komplex-Stabilität hat.

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass weder der TAP-Tag noch der StrepII-Tag einen erheblichen negativen Einfluss auf die MAPK Funktionalität hat. Weiterhin implizieren sie zusammen mit den Daten aus der Gelpermeations-Chromatographie die aussichtsreiche Integration der MPK3-TAP, MPK6-TAP sowie der MPK6-strepII Proteine in hochmolekulare Proteinkomplexe. Es konnte erfolgreich ein System zur Isolation von Proteinen, die mit MAPK assoziiert sind, mittels TAP- und StrepII-Strategie etabliert werden. Die die entsprechenden Vorraussetzungen erfüllenden stabilen Pflanzentransformanten wurden anschließend für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

4.1.2 *Affinitätschromatographie von MAPK mittels TAP und strepII-Tag*

Die Nutzung von transgenen Pflanzen als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie bedingt einige weitere Limitationen. Die Generierung von Material ist relativ zeitintensiv, da die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erst mit einem Alter von vier bis sechs Wochen geerntet wer-

den konnten. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Pflanzen unter den gleichen Bedingungen (Licht, Luftfeuchtigkeit) angezogen wurden, um ein einheitliches Pflanzenmaterial zur Extraktion zur Verfügung zu haben. Das dadurch begrenzte Platzangebot limitierte auch die zeitgleich kultivierbare Pflanzen-Menge. Die Applikation des flg22-Peptids zur Elizitierung der Pflanzen musste aufwendig durch Inokulation in die Rosettenblätter durchgeführt werden, da verschiedene Versuche anderer Applikationsmethoden wie zum Beispiel Sprühen nicht zu den gewünschten zellulären Signalen führten.

Zur Affinitätschromatographie wurde trotzdem sowohl unbehandeltes als auch elizitiertes Pflanzenmaterial eingesetzt. Es ist denkbar, dass die Aktivierung der MAPK Kaskaden nach Flagellin-Perzeption die Stabilität der putativen Signaltransduktions-Komplexe beeinflusst. Möglicherweise liegen diese Komplexe teilweise präformiert im Zytoplasma vor. Eine aktive Signaltransduktion könnte die Interaktionen zwischen den Komponenten der MAPK Kaskaden stabilisieren, um eine schnelle Signaltransduktion zu gewährleisten. Zumindest das Gleichgewicht zwischen MPK3-TAP bzw. MPK6-TAP Monomeren und höhermolekularen Proteinkomplexen war in unbehandelten und flg22-elizitierten Proteinextrakten gleich (Gelpermeations-Chromatographie Abbildung 3-7). Aufgrund dieser Ergebnisse kann jedoch leider keine Aussage über die Stabilität höhermolekularer Strukturen getätigt werden.

Die Stabilität der MAPK Signal-Proteinkomplexe ist jedoch ausschlaggebend für den Erfolg der Affinitäts-Chromatographie. Die untersuchten Komplexe könnten aufgrund ihrer Funktion und der damit verbundenen Anforderungen teilweise ungünstige biochemische Eigenschaften haben, die Protein-Protein-Interaktionen könnten nur schwach ausgebildet oder zu transient sein. Die MAPK Proteinkomplexe waren zumindest zu einem gewissen Teil relativ stabil, da in Proteinextrakten, die über eine Gelpermeations-Chromatographie aufgetrennt wurden, eine Verteilung auf Monomere und höhermolekulare Proteinkomplexe detektiert werden konnte. Nach einer Separierung der höhermolekularen Komplexe dissemblierten diese wieder teilweise in Monomere (Abbildung 3-15). Es könnte also auch bei den untersuchten MAPK Proteinkomplexen, wie bei Proteinkomplexen allgemein (Yang *et al.* 2008), ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Assemblierung und Dissemblierung vorliegen.

Eine Möglichkeit zur Stabilisierung relevanter Proteinkomplexe bietet der Einsatz von chemischen Vernetzern (Gingras *et al.* 2007). Sie kamen auch schon bei der Identifizierung von Interaktionspartnern eines pflanzlichen Hybrid-Glucocorticoid Rezeptors erfolgreich zum Einsatz (Rohila *et al.* 2004). Hierbei wurden die transient in *Nicotiana benthamiana* exprimierte Proteine mit Formaldehyd in geernteten Blättern vernetzt und anschließend über eine Affi-

nitätschromatographie erfolgreich isoliert. Diese Vernetzung war durch Hitze-Einwirkung reversibel.

Die chemische Vernetzung von Proteinen in Pflanzenextrakten war mit verschiedenen Vernetzer-Molekülen erfolgreich. Neben MPK3-TAP Monomeren konnten auch Hinweise auf höhermolekulare Komplexe zwischen 550 und 770 kDa in Gelfiltrations-Experimenten gefunden werden, die in Extrakten ohne Vernetzer-Zusatz abwesend waren (Abbildung 3-17). Diese Ergebnisse sprechen für die spezifische Vernetzung der MAPK Proteinkomplexe, zeigen jedoch auch, dass das bestehende Gleichgewicht zwischen Monomeren und hochmolekularen Komplexen nur mäßig mit chemischen Vernetzern in Richtung der höhermolekularen Komplexe verschoben werden konnte. Deshalb wurden bei den durchgeführten Affinitätschromatographien keine Vernetzungsreaktionen durchgeführt.

Zusätzlich könnten nur Vernetzer-Moleküle eingesetzt werden, die nicht unter reduzierenden Bedingungen, wie sie während der Affinitäts-Chromatographie vorliegen, spaltbar wären. Das würde wiederum die Analyse der Zwischenschritte und des Erfolgs der Anreicherung erschweren, da die Einbindung der MAPK in Proteinkomplexe deren Immuno-Detektion in Proteingelen erschwert. Weiterhin würden Probleme bei der massenspektrometrischen Analyse auftreten, da die irreversibel vernetzten Peptide zusammengesetzte Massen ergeben, die bei der Datenbanksuche nicht richtig zugeordnet werden könnten.

Da Gesamtproteinextrakte aus grünen Rosettenblättern zu 30-60% das abundante Protein RuBisCO enthalten (Xi *et al.* 2006, Cellar *et al.* 2008) und zusätzlich Signalkomplex-Komponenten aufgrund ihrer Funktion eher niedrig abundant sind (Yang *et al.* 2008), wurden weiterhin native Fraktionsmethoden der Extrakte untersucht. Die Abreicherung von RuBisCO führte schon in anderen Arbeiten zur Anreicherung und damit erleichterten Identifizierung von niedriger abundanten Proteinen (Kim *et al.* 2001, Widjaja *et al.* 2009, Xi *et al.* 2006). Widjaja und Kollegen konnten im 20% PEG Überstand, in dem die Menge an RuBisCO sehr stark reduziert war, circa 750 neue Proteinspots gegenüber einem Pflanzen-Totalextrakt in einer 2D-PAGE detektieren. Weiterhin wurden Spots mit erhöhter Abundanz detektiert, die Fraktionierung führte insgesamt zu einer erhöhten Abdeckung des Arabidopsis-Proteoms (Widjaja *et al.* 2009).

Neben der Fraktionierung der Proteinextrakte gibt es auch die Möglichkeit, die RuBisCO über eine Antikörper-basierte Abreicherung mit einer IgY-Säule zu vermindern (Cellar *et al.* 2008). Obwohl damit bis zu 95% der vorhandenen RuBisCO Moleküle aus dem Pflanzenextrakt gebunden werden konnten (Cellar *et al.* 2008), dominierten andere abundante Proteine nach wie vor und überlagerten damit die Detektion niedrig abundanter Proteine (Widjaja *et al.*

2008). Ferner sind die Immuno-Säulen, obwohl regenerierbar, nur für eine begrenzte Proteinmenge einsetzbar. Die in dieser Arbeit eingesetzten Pflanzenmaterial-Mengen (90 g pro Reinigung) sind jedoch zu hoch für eine praktikable Nutzung der Antikörper-basierten RuBisCO-Abreicherung.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb u.a. die RuBisCO-Abreicherung mittels PEG Fraktionierung angewendet. Die MPK6-strepII Proteine akkumulierten im 20% PEG Überstand, wohingegen die RuBisCO bei diesen PEG Konzentration nahezu vollständig präzipitierte (Widjaja *et al.* 2009). Somit konnte eine ausreichende Trennung der abundanten RuBisCO und einem Teil weiterer abundanter Proteine von MPK6-strepII Proteinen erzielt werden.

Im Fall der MPK3-TAP und MPK6-TAP Proteinextrakte wurde keine ausreichende Trennung der abundanten Proteine und MAPK mittels PEG Fraktionierung erreicht. Deshalb wurde eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung untersucht. Ein Anteil von 40% Ammoniumsulfat reichte hier aus, den Hauptteil der sehr abundanten RBCL, der großen Untereinheit der RuBisCO, von den MAPK Komplexen zu separieren.

Weiterhin blieb das Gleichgewicht zwischen den MAPK Monomeren und den höhermolekularen Komplexen intakt (Abbildung 3-13). Die native Vorfraktionierung konnte die Konzentration der MAPK erhöhen und hatte dadurch zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Stabilität der putativen MAPK Proteinkomplexe. Das neutrale Ammoniumsulfat-Salz könnte durch die Komprimierung der Solvations-Schicht der MAPK Proteinkomplexe bei steigenden Konzentrationen hydrophobe Protein-Protein-Interaktionen begünstigen.

Schließlich konnte ein Teil abundanter, unspezifisch bindender Proteine von den MAPK separiert werden. Die Fraktionierungen wirkten sich positiv auf die Zusammensetzung sowohl der TAP- als auch der Strep-Eluate aus. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den TAP- bzw. Strep-Eluaten nach der Affinitätschromatographie von nicht-fraktionierten bzw. fraktionierten Proteinextrakten im Bandenmuster der 1D-SDS-PAGE detektiert werden (Abbildung 3-19, Abbildung 3-20). Zusätzlich könnte die Abreicherung sehr abundanter Proteine die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung niedrig-abundanter, ko-eluierter Proteine steigern.

Der Verlauf der durchgeführten Tandemaffinitäts- bzw. Strep-Affinitätschromatographie wurde jeweils mittels Immuno-Detektion der jeweiligen MAPK validiert. Die entsprechenden MAPK konnten im Eluat detektiert werden, was auf eine erfolgreiche Anreicherung der Köderproteine hindeutete (Abbildung 3-18A, Abbildung 3-20A).

Die Visualisierung der gesamten eluierten Proteine in einer 1D-SDS-PAGE ergab einen hohen Hintergrund in den Kontrollen, die verschiedenen TAP-Eluate waren trotz der Affinitätschromatographie noch sehr komplex. Einen ähnlich starken Hintergrund in der 1D-

SDS-PAGE hatten auch schon andere Arbeitsgruppen, die mit der TAP-Strategie und Arabidopsis Pflanzenmaterial arbeiteten (Batelli *et al.* 2007, Van Leene *et al.* 2008). Auch der Hintergrund der VF-TAP- und VF-Strep-Eluate war relativ hoch, obwohl sich das Bandenmuster insgesamt von den Eluaten ohne vorherige Fraktionierung der Proteinextrakte unterschied.

Wie auch bei Batelli *et al.* 2007 konnten nur marginale Unterschiede zwischen den TAP-Eluaten und ihren jeweiligen Kontrollen in den 1D-Gelen detektiert werden. Auch die Zusammensetzung der VF- und Strep-Eluate unterschied sich kaum visuell von ihren jeweiligen Kontrollen. Teilweise konnte eine sehr prominente Bande detektiert werden (Batelli *et al.* 2007, Van Leene *et al.* 2008), die mit ihrem MG meist dem Köderprotein entsprach und auf dessen Überexpression zurückzuführen war. Da die in dieser Arbeit verwendeten fusionierten MAPK dem natürlichen Level entsprechend exprimiert wurden, konnten die Köderproteine im Eluat nur mittels Immuno-Blot eindeutig identifiziert werden. Trotzdem konnten sowohl bei Batelli und Kollegen (Batelli *et al.* 2007) wie auch in dieser Arbeit in den anschließenden MS-Analysen Unterschiede in der Zusammensetzung der Kontrollen und Proben detektiert werden.

4.2 Identifizierung von mit MPK3 und MPK6 ko-eluierten Proteinen

Die Proteine, die nach einer Protein-Reinigung im Eluat vorhanden sind, korrespondieren eher nicht zu einem einzigen Komplex, sondern stellen oft eine heterogene Mischung verwandter Komplexe dar, wobei einige unvollständig sind, weil sie nicht-proteinogene Komponenten wie Ko-Faktoren oder Nukleinsäuren während der Reinigung verloren haben könnten oder weitere, natürlich vorkommende Sub-Komplexe darstellen (Wodak *et al.* 2009). Die Erfolgsrate einer Affinitätschromatographie hängt damit nicht nur von der Menge der angereicherten Proteinkomplexe, sondern auch von der Sensitivität der Massenspektrometrie ab (Van Leene *et al.* 2008). Dafür muss eine Balance zwischen der Reduktion der unspezifisch bindenden Proteine und dem Erhalt der Interaktion von assoziierten Proteinpartnern gefunden werden (Yang *et al.* 2008).

Eine Möglichkeit, falsch-negative Identifizierungen zu vermindern, besteht in der Kombination von TAP-Eluaten aus mehreren parallel verlaufenden Protein-Reinigungen (Rubio *et al.* 2005) und damit die Erhöhung der Menge an Ausgangsmaterial vor der Chromatographie (Van Leene *et al.* 2008), wie sie auch in dieser Arbeit mit den TAP-Pflanzen Anwendung fand. Das Detektions-Level einzelner Proteinfragmente in einer MS-Analyse wird zusätzlich von ihrer Abundanz, Ionisierbarkeit und von der Größe des ursprünglichen Proteins bestimmt.

Sehr abundante Peptide können miteinander bei der Ionisierung kompetieren und führen somit zu einer Ionensuppression (Van Wijk 2001, Yang *et al.* 2008). Deshalb sind neben der Sensitivität auch die Messparameter ausschlaggebend für die finale Protein-Identifizierungsrate.

Die in dieser Arbeit verwendete MS-Analyse wurde deshalb zur Messung der TAP- und Strep-Eluate optimiert. Die MS-Messungen von aus Gelbanden eluierten Peptiden wurden mit einer 30-minütigen LC-Elution durchgeführt (Abbildung 3-22). Da die *Shotgun* applizierten MPK3-TAP- und MPK6-TAP-Proben eine hohe Komplexität aufwiesen (vgl. 1D-SDS-PAGE Abbildung 3-18) wurde hier die LC-Elution deutlich verlängert (2h ACN-Gradient). Damit konnte eine bessere Auftrennung der Peptide erzielt werden, die zu einer verringerten Ionensuppression führen könnte und dadurch die Detektion erleichterte (Van Wijk 2001, Yang *et al.* 2008). Keratin-Verunreinigungen der Proben wurden durch eine entsprechende Handhabung vermieden, damit diese nicht andere Peptide überlagern und damit maskieren konnten. Mit diesen Maßnahmen sollten auch niedriger abundante Peptide in den komplexen Eluaten detektiert werden können.

Zusätzlich wurde ein weiteres Messprotokoll zur Detektion der Peptide herangezogen. Dabei wurden mit Hilfe einer Peptid-Ausschlussliste (SPL, *scheduled precursor list*) die bereits detektierten Peptide in einer zweiten MS-Messung derselben Probe ausgeschlossen. Durch den Ausschluss abundanter Peptide in der zweiten Messung kann die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung niedrig abundanter Peptidfragmente zusätzlich erhöht werden.

Die Proteine in den Eluaten wurden schließlich über eine Datenbanksuche mit dem Programm MASCOT identifiziert. Um die Datensätze stringenter zu gestalten wurden Proteine, die ausschließlich in den Kontrollen detektiert wurden und damit dem Hintergrund entsprachen, systematisch von der Liste ko-eluierter Proteine subtrahiert (Van Aken *et al.* 2007). Sie könnten aufgrund ihrer hohen Abundanz in den Eluaten angereichert worden sein, haben aber eine höhere Wahrscheinlichkeit Kontaminanten darzustellen als echte Interaktionspartner (Graumann *et al.* 2004, Miernyk und Thelen 2008). Die meisten Kontaminanten waren hochabundante Proteine wie Chaperone, Zytoskelett-Proteine, ribosomale Proteine und metabolische Enzyme. Sie entsprachen – unabhängig von einer vorherigen Fraktionierung der Proteinextrakte – den gleichen Kontaminanten, die auch schon in anderen TAP-MS Analysen in *Arabidopsis* detektiert wurden (Van Aken *et al.* 2007, Van Leene *et al.* 2007).

4.2.1 *Vergleich der Identifizierungen aus der Tandem- und StrepII-Affinitätschromatographie*

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Signaltransduktions-Komplexen sowie die Detektion von MAPK Interaktoren und Gerüst-Proteinen. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf den MAPK, die in die Signaltransduktion nach Flagellin-Perzeption involviert sind. Die Protein-Identifizierungen aus den Eluaten der Affinitätschromatographie wurden deshalb hauptsächlich nach Proteinen mit Funktionen in der Signaltransduktion oder der Pathogen-Abwehr untersucht. Identifizierungen mit putativen Protein-Interaktions-Domänen könnten eine der grundlegenden Funktionen von Gerüst-Proteinen erfüllen, weshalb auch solche Proteine zu den interessanten Identifizierungen gehörten.

Die Protein-Identifizierungen für die MPK3-TAP und MPK6-TAP umfassten neben den MAPK selbst membranständige, chloroplastidäre, ribosomale Proteine und Proteine mit Funktionen in der ATP Bindung und im Metabolismus (Tabelle 3-4, Abbildung A-2) sowie ein Protein mit einer putativen Funktion in der Bakterienabwehr. Diese Phosphoribulo-Kinase, die im VF-MPK3- und VF-MPK6-TAP-Eluat detektiert wurde, besaß weiterhin eine putative Funktion in der ATP- und Proteinbindung (www.arabidopsis.org, TAIR9). Trotzdem ist die direkte Interaktion mit einer der beiden MAPK unwahrscheinlich, da das Enzym zellulär von den MAPK separiert im Chloroplasten lokalisiert war. Bei einem Vergleich der MPK3-TAP und MPK6-TAP Eluate konnten gemeinsame Protein-Identifizierungen festgestellt werden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da beide MAPK teilweise redundante Funktionen in Arabidopsis übernehmen können (vgl. Tabelle 1-1).

In MPK6-Strep-Eluaten konnte die MPK6 selbst nicht identifiziert werden. Die mit MPK6 assoziierten Proteine sollten nicht abundanter sein als die MPK6 selbst, da auch das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen MPK6 Monomeren und Proteinkomplexen eher zu den Monomeren tendierte (Abbildung 3-14). Die hier detektierten Proteine können also nur durch die unspezifische Bindung an die StrepTactin-Matrix angereichert worden sein. Die Abreicherung abundanter Proteine ist demnach unabdinglich im Vorfeld der Strep-Affinitätschromatographie.

Die Analyse von flagellin-elizitiertem Material führte nicht zu einer erhöhten Identifizierungs-Rate von MAPK Interaktoren, hier konnten insgesamt keine auffälligen ko-eluierten Proteine detektiert werden. Jedoch hatten sowohl die wiederholte MS-Analyse unter Verwendung der Peptid-Ausschlussliste als auch die Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung der Proteinextrakte einen positiven Effekt auf die Anzahl der detektierten Peptide der MAPK.

Mittels der Peptid-Ausschlussliste konnten weitere Peptide identifiziert werden, die in den ersten MS-Messungen von abundanteren Peptiden maskiert worden sein könnten. Die zusätzlichen Peptide korrespondierten zu bereits identifizierten Proteinen und führten damit zu einer erhöhten Sequenzabdeckung dieser Proteine. Auch die MPK3 und MPK6 selbst konnten jeweils mit einer höheren Sequenzabdeckung detektiert werden. Damit wurde also auch die Detektions-Wahrscheinlichkeit niedrig abundanter Proteine erfolgreich gesteigert.

Die Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung der Proteinextrakte führte ebenfalls zur Detektion von zusätzlichen Peptiden. Für die beiden Köderproteine MPK3 und MPK6 konnte eine höhere Sequenzabdeckung erzielt werden. Damit bestand auch eine höhere Wahrscheinlichkeit, assoziierte Proteine zu detektieren, was sich auch in weiteren Protein-Identifizierungen gegenüber den TAP-Eluaten ausdrückte (Abbildung 3-24). Die PEG-Fraktionierung der MPK6-Strep-Extrakte hatte ebenfalls eine positive Wirkung. Die MPK6 konnte identifiziert werden, jedoch wurde der Hintergrund in den Strep-Eluaten durch die PEG-Fraktionierung nicht ausreichend dezimiert, da immer noch rund die Hälfte der hier identifizierten Proteine chloroplastidär lokalisiert waren. Die weiterhin dominierenden Kontaminanten könnten vorhandene und weniger abundante, MPK6-assoziierte Proteine verdrängt oder maskiert haben.

Insgesamt gab es jedoch keine gemeinsamen Identifizierungen in den TAP- und VF-TAP-Eluaten. Das könnte bedeuten, dass alle Identifizierungen aus den TAP-Eluaten nur aufgrund ihrer höheren Abundanz unspezifisch an den Köderproteinen assoziiert vorlagen und damit sämtlich falsch-positive Interaktoren darstellten. Auch könnten durch die Fraktionierung einfach nur andere abundante Proteine angereichert worden sein, die dann unspezifisch an den MAPK binden konnten und somit in den VF-TAP-Eluaten detektiert wurden.

Leider konnten schließlich in keinem der Eluate bereits publizierte Interaktionspartner oder Substrate von MPK3 oder MPK6 in den Datensätzen identifiziert werden. Die Arbeitsgruppe um Van Aken war ebenfalls nicht in der Lage, zwei dokumentierte Interaktionspartner der untersuchten PHB Proteine in ihren TAP Komplexen zu identifizieren (Van Aken *et al.* 2007). In anderen Studien wurden wiederum bereits postulierte Interaktionspartner mit der TAP-MS-Strategie detektiert. Van Leene und Kollegen konnten jedoch in Arabidopsis Zellsuspensionskulturen neben 28 neuen molekularen Assoziationen von Zellzyklus-Proteinen 14 bereits beschriebene Interaktionen bestätigen (Van Leene *et al.* 2007). Auch in zwei unabhängigen TAP-MS Hochdurchsatz-Analysen von Protein-Komplexen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden publizierte Proteinkomplexe validiert (Gavin *et al.* 2006, Krogan *et al.* 2006). Die Zusammensetzung der postulierten Proteinkomplexe unterschied sich dennoch bei beiden

Gruppen stark voneinander, obwohl sie ein sich substantiell stark überlappendes Set an Köderproteinen verwendeten und ähnliche ko-eluierte Proteine identifizierten.

Sowohl in den TAP-Eluaten als auch in den Strep-Eluaten war ein Großteil der insgesamt identifizierten Proteine im Chloroplasten lokalisiert, sie stellten höchstwahrscheinlich falsch-positive MAPK Interaktoren dar. Dieser hohe Anteil chloroplastidärer Proteine könnte neben deren Abundanz auch mit einer Kompetition der echten, zytosolischen MAPK Interaktionspartner erklärt werden. Es ist möglich, dass sie eine größere Affinität zu den MAPK besaßen und somit in einem Proteingemisch-Extrakt die echten Interaktionspartner verdrängten. Diese Kompetition wird in einer intakten Pflanzenzelle schließlich durch deren Separierung in verschiedene Zellkompartimente verhindert.

Trotzdem konnten einige Proteine in den hier präsentierten Daten identifiziert werden, die dokumentierte Funktionen der MPK3 und MPK6 widerspiegeln. Ein Viertel aller Identifizierungen aus der Affinitätschromatographie war in biologische Prozesse nach abiotischem oder biotischem Stress involviert, z.B. der Salz-Stressantwort und der Cadmium-Ionen Antwort. Beide, MPK3 und MPK6, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Signaltransduktion nach biotischem (Asai *et al.* 2002) und abiotischem Stress. Für MPK6 wurde bereits eine Funktion in der Salz-Stressantwort dokumentiert (Ichimura *et al.* 2000). Auch die Aktivierung beider MAPK nach Schwermetall-Stress konnte bereits gezeigt werden (Fritsche 2004, Jonak *et al.* 2004).

Die GeLC-Analyse von TAP-Eluaten ergab im Vergleich zu den *Shotgun*-Analysen zwar sehr viel weniger Protein-Identifizierungen, unter den ko-eluierten Proteinen befanden sich jedoch biologisch sehr interessante Proteine: ein Transkriptionsfaktor, eine Salizylsäure-induzierte Rezeptor-Kinase und das in die bakterielle Abwehrantwort involvierte PBS1 (*avrPphB susceptible1*), eine putative Serin/Threonin-Kinase.

Die drei ko-eluierten Proteine, die sowohl in MPK6-TAP- als auch in MPK6-Strep-Eluaten identifiziert werden konnten, enthielten ein metabolisches Enzym, ein Actin und ein ribosomales Protein. Das ribosomale Protein trat dabei nur in Eluaten aus flg22-elizitiertem Pflanzenmaterial auf. Zusätzlich hatten viele weitere ko-eluierte Proteine aus der Affinitätschromatographie Funktionen in der Translation (Tabellen 3-3 bis 3-6).

Im Hinblick auf die vielen verschiedenen Faktoren, die MAPK Kaskaden mit MPK3 und MPK6 Beteiligung aktivieren (Tabelle 1-1), könnten diese beiden MAPK auch eine Rolle im Metabolismus, beim Zyto-Skelett oder in der Translation spielen. Auch in zwei Protein-Array-Studien waren etwa ein Drittel der identifizierten putativen MPK3- und MPK6-Substrate

Proteine, die in den Protein-Metabolismus oder andere metabolische Prozesse involviert sind (Feilner *et al.* 2005, Popescu *et al.* 2009).

Es ist wichtig, ergänzende Daten aus *in vivo*, *in vitro* und *in silico* Strategien heranzuziehen, um Protein-Interaktionen definieren und validieren zu können (Miernyk und Thelen 2008, Morsy *et al.* 2008). Dazu wurden die Ergebnisse aus den in dieser Arbeit angewendeten TAP- und Strep-Affinitätschromatographie miteinander und mit weiteren, auf der Detektion von bivalenten Interaktion beruhenden Interaktions-Studien verglichen (Hefe-Zwei-Hybrid Studie: J. Uhrig, unveröffentlicht, Protein-Arrays: Feilner *et al.* 2005, Popescu *et al.* 2009).

Die Zahl der detektierbaren Interaktionspartner wird in einer Protein-Array-Studie durch die Anzahl der auf dem Array vertretenen Proteine begrenzt. Feilner und Kollegen analysierten die *in vitro* Interaktion von MPK3 und MPK6 mit 1690 Proteinen (in *E.coli* exprimiert, Feilner *et al.* 2005), Popescu und Kollegen untersuchten 2158 Proteine (*in planta* exprimiert, Popescu *et al.* 2009). Jedoch waren nur die Hälfte der in dieser Arbeit mittels Affinitätschromatographie von MPK3-TAP und MPK6-TAP identifizierten Proteine (insgesamt 35) auch auf dem Protein-Array der Arbeitsgruppe um Feilner vertreten, ebenso verhielt es sich mit den Identifizierungen aus der Strep-Affinitätschromatographie (insgesamt 99).

Die Überlappung der hier identifizierten Proteine mit den untersuchten Proteinen der Array-Analyse von Popescu und Kollegen war viel kleiner. Trotzdem war die Zusammensetzung der als putative MPK3 und MPK6 Interaktoren identifizierten Proteine bezogen auf die molekularen Funktionen ähnlich. Struktur-gebende Proteine sowie Proteine mit DNA/RNA- oder anderer Bindung überwogen. Der Anteil von Transkriptions-Faktoren bei den Identifizierungen aus der Affinitätschromatographie war jedoch deutlich geringer.

Der Vergleich der Daten aus der Affinitätschromatographie, den Protein-Arrays und der Hefe-Zwei-Hybrid Studie ergab sieben Übereinstimmungen (Tabelle 4-1). Darunter waren ribosomale und metabolische Proteine. Proteine mit solchen Funktionen wurden jedoch auch schon als Kontaminanten beschrieben (Van Aken *et al.* 2007) und könnten aufgrund ihrer Abundanz auch mit verschiedenen methodischen Ansätzen identifiziert worden sein.

Die Rezeptor-Lectin-Kinase trat sowohl in der MPK6-TAP Affinitätschromatographie als auch in einem Protein-Array als putativer MPK3-Interaktor auf (Popescu *et al.* 2009) und interagierte sehr schwach *in vivo* in einer BiFC-Analyse mit MPK3 (Abbildung 3-31). Diese Interaktion könnte aufgrund einer zu schwachen Interaktion unterbewertet worden sein. Weitere Analysen wie Ko-IP oder ein Phosphorylierungs-Assay mit rekombinant hergestellten Proteinen sollten dazu weitere Hinweise ergeben.

Tabelle 4-1 Vergleich der putativen MPK3- bzw. MPK6 Interaktoren aus der TAP- und Strep-Affinitätschromatographie, Protein-Array-Studien (Feilner *et al.* 2005, Popescu *et al.* 2009) und einer Hefe-2-Hybrid Analyse (J. Uhrig, unveröffentlicht).

<i>AGI Code</i>	<i>Name</i>	<i>TAP</i>	<i>Strep</i>	<i>Protein-Array</i> (1, 2)	<i>Hefe-2-Hybrid</i> <i>Analyse mit MPK6</i>
At2g19730	ribosomales Protein	MPK6		MPK3 (1)	
At2g36530	Phosphopyruvat-Hydratase-Akt.		MPK6		MPK6
At2g40510	ribosomales Protein		MPK6	MPK3, MPK6 (1)	
At3g11510	40S ribosomales Protein		MPK6	MPK3 (1)	
At5g54770	Thiamin-biosynthetisches Gen		MPK6		MPK6
At2g37710	Rezeptor-Lectin-Kinase	MPK6		MPK3 (2)	
At4g20360	GTPase Homolog		MPK6	MPK3 (2)	

(1, Feilner *et al.* 2005, 2, Popescu *et al.* 2009)

Obwohl Witte und Kollegen erfolgreich mit der StrepII-Strategie Proteinkomplexe aus Arabidopsis Pflanzen isolieren konnten und Vorteile gegenüber dem TAP-Tag herausarbeiteten (Witte *et al.* 2004), war die Isolierung von MAPK Proteinkomplexen mittels StrepII-Tag hier weniger erfolgreich. Ein Großteil der identifizierten Proteine war wahrscheinlich falsch-positiv, sie erschienen aufgrund ihrer Abundanz im Eluat und maskierten möglicherweise niedriger abundante Proteine. Dem konnte auch nicht mit der PEG-Fraktionierung der MPK6-strep Proteinextrakte entgegen gewirkt werden, da diese sehr abundante Proteine nur unzureichend abreichern konnte. Auch eine zu kurze Lebensdauer der MAPK Komplexe im Strep-Extraktionspuffer könnte Probleme bei der Detektion wahrer MAPK Interaktoren bedingen, da in Gelfiltrations-Experimenten keine Hinweise auf höhermolekulare Strukturen gefunden werden konnten. Die Protein-Identifizierungen aus der Tandem-Affinitätschromatographie ergaben weniger Kontaminanten, jedoch konnte bei den *Shotgun* Analysen der Eluate nur sehr wenige Proteine identifiziert werden.

Diese Erkenntnisse stellen die große Relevanz der Abundanz der untersuchten Proteine und der möglichst niedrig zu haltenden Hintergrundproteine für eine erfolgreiche Durchführung der Affinitätschromatographie von Proteinkomplexen dar. Die untersuchten Signalkomplexe könnten trotz der Abreicherung abundanter Proteine zu niedrig konzentriert sein, um in den Eluaten der Affinitätschromatographie detektiert werden zu können. Die in dieser Arbeit untersuchten MPK3 und MPK6 können parallel in unterschiedliche Signal-Proteinkomplexe integrieren. Das führt dazu, dass die hier im Fokus stehenden Flagellin-aktivierten Kaskaden nur einen Teil der aus den Pflanzen angereicherten Proteinkomplexe darstellen und ihre Detektion dadurch zusätzlich erschwert wird. Trotzdem kann wahrscheinlich nur ein kombinatorischer Epitop-Tag der Weg für die Ausnutzung des vollen Potentials von

Affinitäts-Tags in einem Hoch-Durchsatz-Rahmen sein, wie er für die Analyse von niedriger abundanten Protein-Komplexen notwendig ist (Waugh 2005).

4.2.2 Validierung putativer Interaktoren

Da die GeLC-Analyse von TAP-Eluaten zeitlich als erste zur Verfügung stand, konnten hier weitere Analysen zu Validierung der Kandidaten als putative MAPK Interaktoren angeschlossen werden. Diese erfolgten zunächst mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC), da diese Methode auch die Visualisierung schwacher und transienter Protein-Interaktionen ermöglicht (Kerppola 2006, Kerppola 2008, Walter *et al.* 2004). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der schnellen *in vivo* Analyse mehrerer Protein-Interaktionen sowie der intrazellulären Lokalisation.

Mittels BiFC-Analysen konnten erste Hinweise auf eine tatsächliche Interaktion zwischen MPK3 und PBS1 gefunden werden. Die Ko-Expression von PBS1-YFP^C mit der MPK3-YFP^N führte zu einem positiven Ergebnis (Abbildung 3-31). Die *in vivo* Interaktion von PBS1-YFP^C mit MPK6-YFP^N wurde in eine Signifikanzklasse eingeordnet, die zwischen den Negativ-Kontrollen und der PBS1-MPK3 Interaktion lag. Sie könnte aufgrund einer sehr schwachen Interaktion beider Proteine unterbewertet werden.

PBS1 (*avrPphB* suszeptibel 1), eine putative Serin/Threonin-Kinase, wurde ursprünglich als ko-eluiertes Protein aus der MPK6-TAP Proteinreinigung identifiziert, interagiert aber nach der BiFC Analyse *in vivo* schwach mit der MPK3 und nur sehr schwach mit der MPK6. Dieses Phänomen könnte mit der bereits erwähnten Redundanz der beiden MAPK erklärt werden.

PBS1 agiert wahrscheinlich als genereller Regulator in der PTI und wird von R-Proteinen kontrolliert (Göhre und Robatzek 2008). Zusammen mit dem Resistenz-Protein RPS5 wird es spezifisch für die *AvrPphB*-induzierte HR bei dem Befall mit den entsprechenden *Pseudomonas syringae* Stämmen benötigt (Ade *et al.* 2007, Shao *et al.* 2003, Warren *et al.* 1999). Die RPS5-vermittelte Resistenz war in *pbs1* Mutanten von *Arabidopsis thaliana* komplett blockiert (Swiderski und Innes 2001). Das *AvrPphB*-Genprodukt ist eine Cystein-Protease, die über das Typ-III-Sekretionssystem in Pflanzenzellen injiziert wird und spezifisch das PBS1 Protein spaltet (Zhu *et al.* 2004).

Ade und Kollegen postulierten ein Model über den molekularen Mechanismus, nachdem RPS5 in der Zelle durch eine Autoinhibierung inaktiviert und gebunden an PBS1 vorliegt. Zusätzlich ist diese Struktur an ADP gebunden. Die *AvrPphB*-vermittelte Spaltung von PBS1, die unabhängig von der Kinase-Aktivität ist (Shao *et al.* 2003), führt zu einer Konformations-Änderung des RPS5 Proteins und einem Austausch von ADP zu ATP (Ade *et al.* 2007). Die

MAP Kinasen MPK3 und/oder MPK6 könnten eine Rolle bei Phosphorylierungs-Vorgängen in der *avrPphB*-RPS5 Gen-für-Gen Interaktion spielen oder an *downstream* Vorgängen beteiligt sein.

Um die Daten aus der Affinitätschromatographie und den BiFC-Analysen zu validieren sollten weitere Experimente erfolgen. Nach der eingehenden Validierung der Assoziierung von PBS1 mit MPK3 und/oder MPK6 durch weitere Interaktions-Studien (Ko-IP, GST-Pulldown) könnte mit Hilfe von Kinase Assays und T_pEYp-Western validiert werden, ob die MPK3 und/oder MPK6 *up-* oder *downstream* von PBS1 liegt. Ein Kinase Assay sollte Aufschluss darüber geben, ob PBS1 von der MPK3 und/oder auch der MPK6 phosphoryliert werden kann. Zumindest eine putative Phosphorylierungs-Stelle (Serin-Prolin-Motiv) konnte im PBS1 C-Terminus detektiert werden. Wenn PBS1 *upstream* von MPK3/MPK6 liegen würde, sollten die beiden MAPK nur im Wildtyp, nicht jedoch in *pbs1* oder *rps5* Mutanten, nach *avrPphB*-Perzeption phosphoryliert vorliegen, was durch eine T_pEYp-Immuno-Detektion schnell und einfach nachweisbar wäre.

Weiterhin sollten Analysen der *mpk3* und *mpk6* Mutanten nach *avrPphB*-Perzeption erfolgen. Eventuell detektierte Phänotypen, die u.a. gegen das Avirulenzgen *avrPphB* tragende *Pseudomonas syringae* Stämme suszeptibel sein können, könnten die Rolle der MPK3/MPK6 in der dadurch ausgelösten Signalkaskade validieren und weitere Rückschlüsse auf biologische Funktionen zulassen.

4.2.3 Möglichkeiten zur Identifizierung weiterer MAPK Interaktoren aus *Arabidopsis thaliana*

Ein wesentlicher Nachteil einer Proteomanalyse gegenüber einer Genomanalyse ist, dass Proteine nicht wie DNA amplifiziert und damit einfacher analysiert werden können. Proteine haben zusätzlich eine große Vielfalt physikochemischer Eigenschaften. Diese führt dazu, dass keine allgemeingültige Strategie für deren Analyse aufgestellt werden kann.

Auch die hier verwendete Strategie der Tandem-Affinitätschromatographie wurde bereits für verschiedene Proteinklassen und Organismen optimiert. Der in dieser Arbeit verwendete TAP-Tag wurde ursprünglich für Hefe-Proteomanalysen entwickelt (Rigaut *et al.* 1999). Einige Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der Anpassung des Reinigungsprotokolls (Rohila *et al.* 2004) oder mit einer Verbesserung des Epitop-Tags selbst. So wurden bereits verbesserte, von TAP-Tag abgeleitete Epitop-Tags für Metazoa allgemein (Cheeseman und Desai 2005) oder spezifische Organismen wie Menschen (Knuesel *et al.* 2003) und für den Einsatz im pflanzlichen System (Rohila *et al.* 2004; Van Leene *et al.* 2008) beschrieben. Teilweise wurde

eine andere Zusammenstellung zu einem neuartigen TAP-Tag postuliert („TAPa-Tag“ Rubio *et al.* 2005, „HPB-Tag“ Qi *et al.* 2009).

Es ist fraglich, ob mit den beschriebenen Verbesserungen des TAP-Tag auch in dieser Arbeit bessere Ergebnisse erzielt hätten werden können. Einige Vorschläge fanden auch in der Optimierung des hier verwendeten TAP-Protokolls Verwendung. So wurde der TEV-Protease Verdau unter Zugabe von PMSF durchgeführt, um die bei Rohila und Kollegen beschriebenen Probleme zu vermeiden. Dort wurde die unspezifische Bindung einer Protease an die IgG-Matrix beobachtet, die die Elution von Protease-sensitiven Proteinkomplexen stark behindert haben könnte (Rohila *et al.* 2004).

Aufbauend auf den hier erarbeiteten Verbesserungen der Isolierung und Detektion von MAPK Interaktoren könnten die verwendeten stabilen TAP-Pflanzentransformanten vielleicht doch noch erfolgreich zur Analyse herangezogen werden. Diese Strategie würde die Proteinextraktion einer großen Menge Pflanzenmaterial ohne Detergenz-Zusätze beinhalten, um die Kontamination mit chloroplastidären Proteinen möglichst gering zu halten. Nach der Tandem-Affinitätschromatographie könnte eine 2D-DIGE-Analyse erfolgen. In Kontrollen und Proben differentiell angereicherte Protein-Spots würden anschließend mit LC-MS/MS identifiziert. Zusätzlich sollte zur Überprüfung der Methodik ein publiziertes Beispiel eines abundanten, stabilen pflanzlichen Proteinkomplexes mitgeführt werden, anhand dessen der Erfolg der Optimierungen schnell und einfach nachvollzogen werden kann.

Im Rahmen von *Shotgun*-Analysen der TAP-Eluat könnten die proteolytischen Peptide zusätzlich mittels *Free Flow* Elektrophorese (FFE) oder zweidimensionaler Flüssigchromatographie (2D-LC) aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden. Die dadurch erzielte weitere Auftrennung der einzelnen Peptide kann die Wahrscheinlichkeit der Detektion niedrig-abundanter Peptide weiter erhöhen. Die Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht auch weitere experimentelle Sequenzen, z.B. SRM (*single reaction monitoring*) oder MRM (*multiple reaction monitoring*). Diese Experimente können die Spezifität der Detektion proteotypischer Peptide erhöhen. Im Fall der hier untersuchten Komplexe könnte damit nach Peptidfragmenten bereits bekannter MPK3 und MPK6 Interaktoren gesucht werden, um die angewandte Methodik und deren Optimierung zu überprüfen. Weiterhin bieten sich relative quantitative Proteomics-Verfahren wie SILAC (*stable isotope labeling of amino acids in cell culture*, Guerrero *et al.* 2006), iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*, Chang *et al.* 2009) oder ICAT (*isotope-coded affinity tagging*, Haqqani *et al.* 2008) gefolgt von MudPIT (*multidimensional protein identification technology*)-Analysen an.

Zusätzlich sollten andere Verfahren zur Analyse von MAPK Interaktoren herangezogen werden um schließlich aus verschiedenen methodischen Ansätzen Hinweise auf MAPK Interaktoren zu erhalten.

Obwohl die Ko-IP bereits erfolgreich zur Isolierung von Proteinkomplexen eingesetzt werden konnte (Paul *et al.* 2009), ist die Methode nicht für eine Hochdurchsatz-Analyse von MAPK Komplexen aus Arabidopsis geeignet. Die Anreicherung der Zielproteine erfolgt hier über immobilisierte Antiseren. Dafür wird allerdings ein spezifischer und hochaffin bindender Antikörper benötigt, der eine hohe Stabilität des Antikörper-Antigen-Komplexes voraussetzt. Zur Generierung von Peptidantikörpern sollten relativ kurze und für das Zielprotein sequenz-spezifische Peptid-Antigene verwendet werden, was bei der Arabidopsis MAPK Multigen-Familien eine Herausforderung darstellt. Weiterhin sind die MAPK Komplexe niedrig abundant, in Proteinextrakten überwiegen Monomere. Obwohl eine große Menge Ausgangsmaterial diesen Nachteil mildern könnte, ist die Generierung und Reinigung einer korrespondierenden Menge an spezifischem Antiserum wahrscheinlich zu zeit- und kostenintensiv.

Allgemeine Proteomics-Ansätze könnten zur Identifizierung neuer Proteinkomplexe führen, zum Beispiel gel-basierte Quantifizierungen wie 2D-Gelelektrophorese (2DE), differentielle Gelelektrophorese (DIGE) oder *blue native*- (BN-) PAGE aus Total- oder Teilextrakten. Die BN-PAGE wurde ursprünglich für die Analyse von Membranproteinen etabliert (Eubel, Braun und Millar 2005), trotzdem konnten in einer Studie Proteine aus fast allen Zellkompartimenten und Molekülfunktionen aus *Nicotiana tabacum* BY-2 Zellsuspensionskultur-Totalextrakten identifiziert werden (Remmerie *et al.* 2009). Darunter waren sowohl bereits dokumentierte als auch neue, undokumentierte Proteinkomplexe. Die Fähigkeit zur gleichzeitigen Analyse von membranassoziierten und freien Proteinkomplexen ist ein Vorteil gegenüber der TAP-Strategie und der Ko-Immunopräzipitation (Remmerie *et al.* 2009). Jedoch waren phosphorylierungs-abhängige Protein-Interaktionen unterrepräsentiert, was die Autoren auf deren transiente Natur zurückführten.

4.3 Zusammenfassung

Mitogenaktivierte Protein-Kinasen (MAPK) spielen in der Signaltransduktion und der Zellantwort auf externe Stimuli eine zentrale Rolle (Ichimura *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2006, Tena *et al.* 2001). Sie sind in Netzwerken organisiert, wobei einzelne Signalkomponenten auch in verschiedenen Kaskaden eingesetzt werden können. Die Spezifität kann über die Kompartimentierung der Komponenten oder über Adapter- und Gerüstproteine erfolgen (Burack und Shaw 2000, Schwartz und Madhani 2006, Tsunoda *et al.* 1998). In dieser Arbeit wurden solche Kinase-Interaktionen mittels Massenspektrometrie und Tandem-Affinitätschromatographie (TAP, Rigaut *et al.* 1999) bzw. StrepII-Affinitätschromatographie (Witte *et al.* 2004) in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Anreicherung von Proteinkomplexen der in die Pathogen-Abwehr involvierten MAP Kinasen.

Hinweise auf prä-formierte MAPK Komplexe in *Arabidopsis thaliana* konnten bereits mittels Gelpermeations-Chromatographie für die Wildtyp und die TAP-markierten MPK3 und MPK6 erhalten werden. Die Fusionsproteine MPK3-TAP, MPK6-TAP und MPK6-strepII waren vollständig funktional. Nach flg22-Elizitierung lagen die markierten MPK3 und MPK6 phosphoryliert vor und konnten ein artifizielles Substrat in einem Aktivitäts-Assay umsetzen. Diese Daten wiesen auf eine erfolgreiche Integration der markierten MAPK in ihre physiologisch relevanten Signalkaskaden hin.

Die Affinitätschromatographie erfolgte jeweils mit Blattmaterial von stabilen Pflanzen-Transformanten, da keine einsetzbaren Zellkultur-Transformanten generiert werden konnten. RuBisCO und andere abundante Kontaminanten konnten durch eine Vorfraktionierung erfolgreich abgereichert werden. Die ko-eluierten Proteine wurden anschließend in einer GeLC- oder einer *Shotgun*-Analyse mittels 1D-nano-LC-ESI-IT-MS/MS untersucht.

Neben den markierten MAPK selbst konnten weitere ko-eluierte Proteine in den Eluaten aus beiden Affinitätschromatographie-Ansätzen identifiziert werden. Dabei traten bei der StrepII-Proteinreinigung mehr falsch-positive Identifizierungen auf, da weder die Einschnitt-Strategie noch die damit kombinierte PEG-Vorfraktionierung ausreichend zur Abreicherung der Kontaminanten und der Anreicherung von MAPK Proteinkomplexen war. Die Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung und Tandem-Affinitätschromatographie führte dagegen zu einer ausreichenden Anreicherung von Proteinkomplexen. Damit konnten erfolgreich einige interessante ko-eluierte Proteine identifiziert werden, von denen PBS1 (*avrPphB susceptible1*) in einer anschließenden BiFC-Analyse erste Hinweise auf eine schwache *in vivo* Interaktion mit der MPK3 lieferte.

4.4 Abstract

Mitogen-activated protein (MAP) kinases play a central role in signal transduction and control of different outputs in response to diverse stimuli (Ichimura *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2006, Tena *et al.* 2001). They are organised in distinct networks, which can share multiple signalling components. Pathway specificity is realised by structures like scaffold, anchor or adaptor proteins (Burack and Shaw 2000, Schwartz and Madhani 2006, Tsunoda *et al.* 1998). In this study such protein-kinase interactions were analysed with mass spectrometry (MS) and Tandem Affinity Purification (TAP, Rigaut *et al.* 1999) as well as StrepII affinity purification (Witte *et al.* 2004) of tagged MAP kinases involved in plant-pathogen interactions.

The existence of pre-formed MAP kinase complexes in *Arabidopsis thaliana* was indicated by size exclusion chromatography and could be demonstrated for both untagged and tagged MAP kinases, MPK3 and MPK6. The fusion proteins MPK3-TAP, MPK6-TAP und MPK6-strepII also exhibited full protein functions. After flg22 treatment MPK6 and MPK3 exhibited phosphorylation activity in an activity assay. These data indicate integration of the tagged kinases into physiologically relevant pathways.

The Affinity Purification was performed with leaf material from stable transgenic plants because no suitable stable cell cultures could be generated. RuBisCO and additional abundant contaminants could be reduced by prefractionation. The co-purified proteins were assayed by GeLC or shotgun analysis and 1D-nano-LC-ESI-IT-MS/MS.

Besides the MAPKs themselves additional proteins could be identified from both affinity chromatography strategies. Protein enrichment via strepII-tag resulted in more false-positives because neither one-step strategy nor PEG prefractionation was sufficient for the reduction of contaminants and enrichment of the MAPK complexes. On the other hand ammonium sulphate fractionation and TAP resulted in sufficient enrichment of protein complexes. Some interesting co-eluted proteins could be identified such as PBS1 (*avrPphB susceptible1*), with which first hints of a weak *in vivo* interaction with MPK3 could be validated in a BiFC assay.

Literaturverzeichnis

- Abe, Makoto, Masayuki Fujiwara, Ken-Ichi Kurotani, Shuji Yokoi, und Ko Shimamoto. „Identification of dynamin as an interactor of rice GIGANTEA by tandem affinity purification (TAP).“ *Plant & cell physiology* 49, Nr. 3 (Mar 2008): 420-32.
- Ade, Jules, Brody J DeYoung, Catherine Golstein, und Roger W Innes. „Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, Nr. 7 (Feb 2007): 2531-6.
- Aebersold, Ruidi, und Matthias Mann. „Mass spectrometry-based proteomics.“ *Nature* 422, Nr. 6928 (Jan 2003): 198-207.
- Ahlfors, Reetta, Violetta Macioszek, Jason Rudd, Mikael Brosché, Rita Schlichting, Dierk Scheel, Jaakko Kangasjärvi. „Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40, Nr. 4 (Nov 2004): 512-22.
- Alberts, B. „The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists.“ *Cell* 92, Nr. 3 (Feb 1998): 291-4.
- Andersson, Jessica, David M Simpson, Maosong Qi, Yunmei Wang, und Elaine A Elion. „Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes.“ *The EMBO Journal* 23, Nr. 13 (Jul 2004): 2564-76.
- Andreasson, Erik, Thomas Jenkins, Peter Brodersen, Stephan Thorgrimsen, Nikolaj H T Petersen, Shijiang Zhu, Jin-Long Qiu, Pernille Micheelsen, Anne Rocher, Morten Petersen, Mari-Anne Newman, Henrik Bjørn Nielsen, Heribert Hirt, Imre Somssich, Ole Mattsson, und John Mundy. „The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses.“ *The EMBO Journal* 24, Nr. 14 (Jul 2005): 2579-89.
- Arabidopsis Genome Initiative. „Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.“ *Nature* 408, Nr. 6814 (Dec 2000): 796-815.
- Asai, Tsuneaki, Guillaume Tena, Joulia Plotnikova, Matthew R. Willmann, Wan-Ling Chiu, Lourdes Gomez-Gomez, Thomas Boller, Frederick M. Ausubel, und Jen Sheen. „MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity.“ *Nature* 415, Nr. 6875 (Feb 2002): 977-83.
- Baerenfaller, Katja, Jonas Grossmann, Monica A Grobei, Roger Hull, Matthias Hirsch-Hoffmann, Shaul Yalovsky, Philip Zimmermann, Ueli Grossniklaus, Wilhelm Gruissem, und Sacha Baginsky. „Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics.“ *Science (New York, NY)* 320, Nr. 5878 (May 2008): 938-41.
- Bashor, Caleb J, Noah C Helman, Shude Yan, und Wendell A Lim. „Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics.“ *Science (New York, NY)* 319, Nr. 5869 (Mar 2008): 1539-43.
- Batelli, Giorgia, Paul E. Verslues, Fernanda Agius, Quansheng Qiu, Hiroaki Fujii, Songqin Pan, Karen S. Schumaker, Stefania Grillo, und Jian-Kang Zhu. „SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity.“ *Molecular and cellular biology* 27, Nr. 22 (Nov 2007): 7781-90.
- Bauer, Andreas, und Bernhard Kuster. „Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes.“ *European Journal of Biochemistry* 270, Nr. 4 (Feb 2003): 570-8.

Bent, Andrew F, und David Mackey. „Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions.“ *Annual review of phytopathology* 45 (Jan 2007): 399-436.

Benzinger, Anne, Nemone Muster, Heike B Koch, John R Yates, und Heiko Hermeking. „Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4, Nr. 6 (Jun 2005): 785-95.

Bethke, Gerit, Tino Unthan, Joachim F Uhrig, Yvonne Pöschl, Andrea A Gust, Dierk Scheel, und Justin Lee. „Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, Nr. 19 (May 2009): 8067-72.

Bhattacharyya, Roby P, Attila Reményi, Brian J. Yeh, und Wendell A. Lim. „Domains, motifs, and scaffolds: The role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits.“ *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006a): 655-80.

Bhattacharyya, Roby P, Attila Reményi, Matthew C Good, Caleb J Bashor, Arnold M Falick, und Wendell A Lim. „The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway.“ *Science (New York, NY)* 311, Nr. 5762 (Feb 2006b): 822-6.

Blackstock W, Mann M, editors (2000) *Proteomics: A Trends Guide*. Elsevier, Amsterdam

Blum, Helmut, Hildburg Beier, und Hans J Gross. „Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.“ *Electrophoresis* 8 (1987): 93-99.

Bracha-Drori, Keren, Keren Shichrur, Aviva Katz, Moran Oliva, Ruthie Angelovici, Shaul Yalovsky, und Nir Ohad. „Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40, Nr. 3 (Nov 2004): 419-27.

Brodersen, Peter, Morten Petersen, Henrik Bjørn Nielsen, Shijiang Zhu, Mari-Anne Newman, Kevan M. Shokat, Steffen Rietz, Jane Parker, und John Mundy. „*Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47, Nr. 4 (Aug 2006): 532-46.

Bürckstümmer, Tilmann, Keiryn L Bennett, Adrijana Preradovic, Gregor Schütze, Oliver Hantschel, Giulio Superti-Furga, und Angela Bauch. „An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells.“ *Nature Methods* 3, Nr. 12 (Dec 2006): 1013-9.

Camacho-Carvajal, Margarita M, Bernd Wollscheid, Ruedi Aebersold, Viktor Steimle, und Wolfgang W A Schamel. „Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3, Nr. 2 (Feb 2004): 176-82.

Caspersen, Mikael B, Jin-Long Qiu, Xumin Zhang, Erik Andreasson, Henrik Naested, John Mundy, und Birte Svensson. „Phosphorylation sites of *Arabidopsis* MAP kinase substrate 1 (MKS1).“ *Biochimica et biophysica acta* 1774, Nr. 9 (Sep 2007): 1156-63.

Cellar, Nicholas A, Krishnamoorthy Kuppannan, Marsha L Langhorst, Weiting Ni, Ping Xu, und Scott A Young. „Cross species applicability of abundant protein depletion columns for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.“ *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 861, Nr. 1 (Jan 2008): 29-39.

Chang, Ing-Feng, Amy Curran, Rebekah Woolsey, David Quilici, John C. Cushman, Ron Mittler, Alice Harmon, und Jeffrey F. Harper. „Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*.“ *Proteomics* 9, Nr. 11 (Jun 2009): 2967-85.

- Cheeseman, Iain M, und Arshad Desai. „A Combined Approach for the Localization and Tandem Affinity Purification of Protein Complexes from Metazoans.“ *Science's STKE* 2005, Nr. 266 (Jan 2005).
- Chinchilla, Delphine, Cyril Zipfel, Silke Robatzek, Birgit Kemmerling, Thorsten Nürnberger, Jonathan D G Jones, Georg Felix, und Thomas Boller. „A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence.“ *Nature* 448, Nr. 7152 (Jul 2007): 497-500.
- Chinchilla, Delphine, Zsuzsa Bauer, Martin Regenass, Thomas Boller, und Georg Felix. „The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception.“ *The Plant cell* 18, Nr. 2 (Feb 2006): 465-76.
- Chisholm, Stephen T, Gitta Coaker, Brad Day, und Brian J Staskawicz. „Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.“ *Cell* 124, Nr. 4 (Feb 2006): 803-14.
- Clough, S J, und A F Bent. „Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16, Nr. 6 (Dec 1998): 735-43.
- Colcombet, Jean, und Heribert Hirt. „Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes.“ *The Biochemical journal* 413, Nr. 2 (Jul 2008): 217-26.
- Collins, Mark O, und Jyoti S Choudhary. „Mapping multiprotein complexes by affinity purification and mass spectrometry.“ *Current opinion in biotechnology* 19, Nr. 4 (Aug 2008): 324-30.
- Corpet, F. „Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.“ *Nucleic acids research* 16, Nr. 22 (1988): 10881-90.
- Dangl, Jeffery L. „Innate immunity. Plants just say NO to pathogens.“ *Nature* 394, Nr. 6693 (Aug 1998): 525, 527.
- Dangl, Jeffery L, K Hauffe, S Lipphardt, K Hahlbrock, und Dierk Scheel. „Parsley protoplasts retain differential responsiveness to u.v. light and fungal elicitor.“ *The EMBO Journal* 6, Nr. 9 (Sep 1987): 2551-2556.
- Dangl, Jeffery L, und Jonathan D Jones. „Plant pathogens and integrated defence responses to infection.“ *Nature* 411 (Jan 2001): 826-33.
- Dard, Nicolas, und Matthias Peter. „Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms.“ *BioEssays* 28, Nr. 2 (Feb 2006): 146-56.
- Djamei, Armin, Andrea Pitzschke, Hirofumi Nakagami, Iva Rajh, und Heribert Hirt. „Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling.“ *Science (New York, NY)* 318, Nr. 5849 (Oct 2007): 453-6.
- Droillard, Marie-Jo, Marie Boudsocq, Hélène Barbier-Brygoo, und Christiane Laurière. „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 letters* 574, Nr. 1-3 (Sep 2004): 42-8.
- Eubel, Holger, Hans-Peter Braun, und A Harvey Millar. „Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions.“ *Plant Methods* 1, Nr. 1 (Nov 2005): 11.

Feilner, Tanja, Claus Hultschig, Justin Lee, Svenja Meyer, Richard G. H. Immink, Andrea Koenig, Alexandra Possling, Harald Seitz, Allan Beveridge, Dierk Scheel, Dolores J. Cahill, Hans Lehrach, Jürgen Kreuzberger, und Birgit Kersten. „High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4, Nr. 10 (Oct 2005): 1558-68.

Felix, Georg, Juliana D Duran, Sigrid Volko, und Thomas Boller. „Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18, Nr. 3 (May 1999): 265-76.

Forreiter, und Kirschner. „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, Nr. 12 (1997): 2171-81.

Fritsche, Thomas. „Funktionelle Charakterisierung der MAP-Kinase MPK11 aus Arabidopsis thaliana.“ *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (Aug 2004): 86.

Gao, Zhiyong, Yi-Feng Chen, Melynda D. Randlett, Xue-Chu Zhao, Jennifer L. Findell, Joseph J. Kieber, and G. Eric Schaller. „Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes.“ *The Journal of biological chemistry* 278, Nr. 36 (Sep 2003): 34725-32.

Gavin, Anne-Claude, Patrick Aloy, Paola Grandi, Roland Krause, Markus Boesche, Martina Marzioch, Christina Rau, Lars Juhl Jensen, Sonja Bastuck, Birgit Dümpelfeld, Angela Edelmann, Marie-Anne Heurtier, Verena Hoffman, Christian Hoefert, Karin Klein, Manuela Hudak, Anne-Marie Michon, Malgorzata Schelder, Markus Schirle, Marita Remor, Tatjana Rudi, Sean Hooper, Andreas Bauer, Tewis Bouwmeester, Georg Casari, Gerard Drewes, Gitte Neubauer, Jens M Rick, Bernhard Kuster, Peer Bork, Robert B Russell, und Giulio Superti-Furga. „Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery.“ *Nature* 440, Nr. 7084 (Mar 2006): 631-6.

Gijzen, Mark, und Thorsten Nürnberger. „Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa.“ *Phytochemistry* 67, Nr. 16 (Aug 2006): 1800-7.

Gingras, Anne-Claude, Matthias Gstaiger, Brian Raught, und Ruedi Aebersold. „Analysis of protein complexes using mass spectrometry.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, Nr. 8 (Aug 2007): 645-54.

Göhre, Vera, und Silke Robatzek. „Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity.“ *Annual review of phytopathology* 46 (Jan 2008): 189-215.

Gómez-Gómez, Lourdes, Georg Felix, und Thomas Boller. „A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 18, Nr. 3 (May 1999): 277-84.

Gómez-Gómez, Lourdes, Zsuzsa Bauer, und Thomas Boller. „Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis.“ *The Plant cell* 13, Nr. 5 (May 2001): 1155-63.

Gómez-Gómez, Lourdes. „Plant perception systems for pathogen recognition and defence.“ *Molecular immunology* 41, Nr. 11 (Nov 2004): 1055-62.

Gómez-Gómez, Lourdes, und Thomas Boller. „Flagellin perception: a paradigm for innate immunity.“ *Trends in Plant Science* 7, Nr. 6 (Jun 2002): 251-6.

Graumann, Johannes, Leslie A. Dunipace, Jae Hong Seol, W. Hayes McDonald, John R. Yates, Barbara J. Wold, und Raymond J. Deshaies. „Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3, Nr. 3 (Mar 2004): 226-37.

Guerrero, Cortnie, Christian Tagwerker, Peter Kaiser, und Lan Huang. „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.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, Nr. 2 (Feb 2006): 366-78.

Haqqani, Arsalan S, John F Kelly, und Danica B Stanimirovic. „Quantitative protein profiling by mass spectrometry using isotope-coded affinity tags.“ *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 439 (Jan 2008): 225-40.

Ichimura, Kazuya, Tsuyoshi Mizoguchi, Kenji Irie, Peter Morris, Jérôme Giraudat, Kunihiro Matsumoto, und Kazuo Shinozaki. „Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in Arabidopsis.“ *Biochemical and biophysical research communications* 253, Nr. 2 (Dec 1998): 532-43.

Ichimura, Kazuya, Tsuyoshi Mizoguchi, Riichihiro Yoshida, Takashi Yuasa, und Kazuo Shinozaki. „Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24, Nr. 5 (Dec 2000): 655-65.

Ichimura, und MAPK Group. „Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature.“ *Trends in Plant Science* 7, Nr. 7 (Jul 2002): 301-8.

Ingle, Robert A, Maryke Carstens, und Katherine J Denby. „PAMP recognition and the plant-pathogen arms race.“ *BioEssays* 28, Nr. 9 (Sep 2006): 880-9.

Jonak, Claudia, Hirofumi Nakagami, und Heribert Hirt. „Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium.“ *Plant Physiology* 136, Nr. 2 (Oct 2004): 3276-83.

Jones, Jonathan D G, und Jeffery L Dangl. „The plant immune system.“ *Nature* 444, Nr. 7117 (Nov 2006): 323-9.

Joo, Sunjoo, Yidong Liu, Abraham Lueth, und Shuqun Zhang. „MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54, Nr. 1 (Apr 2008): 129-40.

Kaiser, Peter, David Meierhofer, Xiaorong Wang, und Lan Huang. „Tandem affinity purification combined with mass spectrometry to identify components of protein complexes.“ *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 439 (Jan 2008): 309-26.

Keller, Andrew, Alexey I Nesvizhskii, Eugene Kolker, und Ruedi Aebersold. „Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.“ *Analytical chemistry* 74, Nr. 20 (Oct 2002): 5383-92.

Kerppola, Tom K. „Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells.“ *Methods in cell biology* 85 (Jan 2008): 431-70.

Kerppola, Tom K. „Complementary methods for studies of protein interactions in living cells.“ *Nature Methods* 3, Nr. 12 (Dec 2006): 969-71.

Kim, Sun Tae, Kyu Seong Cho, Yu Sin Jang, Kyu Young Kang. „Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays.“ *Electrophoresis* 22, Nr. 10 (Jun 2001): 2103-9.

Knuesel, Matthew, Yong Wan, Zhan Xiao, Eric Holinger, Nick Lowe, Wei Wang, und Xuedong Liu. „Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2, Nr. 11 (Nov 2003): 1225-33.

Köcher, Thomas, und Giulio Superti-Furga. „Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks.“ *Nature Methods* 4, Nr. 10 (Oct 2007): 807-15.

Koncz, Csaba, und Jeff Schell. „The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector.“ *Molecular and General Genetics MGG* 204, Nr. 3 (Apr 1986): 383-396.

Koncz, Csaba, K Németh, G P Rédei, und Jeff Schell. „T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis.“ *Plant molecular biology* 20, Nr. 5 (Dec 1992): 963-76.

Krogan, Nevan J, Gerard Cagney, Haiyuan Yu, Gouqing Zhong, Xinghua Guo, Alexandr Ignatchenko, Joyce Li, Shuye Pu, Nira Datta, Aaron P Tikuisis, Thanuja Punna, José M Peregrín-Alvarez, Michael Shales, Xin Zhang, Michael Davey, Mark D Robinson, Alberto Paccanaro, James E Bray, Anthony Sheung, Bryan Beattie, Dawn P Richards, Veronica Canadien, Atanas Lalev, Frank Mena, Peter Wong, Andrei Starostine, Myra M Canete, James Vlasblom, Samuel Wu, Chris Orsi, Sean R Collins, Shamanta Chandran, Robin Haw, Jennifer J Rilstone, Kiran Gandhi, Natalie J Thompson, Gabe Musso, Peter St Onge, Shaun Ghanny, Mandy HY Lam, Gareth Butland, Amin M Altaf-Ul, Shigehiko Kanaya, Ali Shilatifard, Erin O’Shea, Jonathan S Weissman, C James Ingles, Timothy R Hughes, John Parkinson, Mark Gerstein, Shoshana J Wodak, Andrew Emili, und Jack F Greenblatt. „Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Nature* 440, Nr. 7084 (Mar 2006): 637-43.

Kuhle, Katja. „Die Charakterisierung potentieller MAP-Kinase- Interaktionsproteine aus Arabidopsis thaliana.“ *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (Oct 2008): 92.

Laemmli, U K. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* 227, Nr. 5259 (Aug 1970): 680-5.

Lalonde, Sylvie, David W Ehrhardt, Dominique Loqué, Jin Chen, Seung Y Rhee, und Wolf B Frommer. „Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 53, Nr. 4 (Feb 2008): 610-35.

Lee, Jin Suk, und Brian E Ellis. „Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs.“ *The Journal of biological chemistry* 282, Nr. 34 (Aug 2007): 25020-9.

Lee, Justin, Jason J Rudd, Violetta K Macioszek, und Dierk Scheel. „Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley.“ *The Journal of biological chemistry* 279, Nr. 21 (May 2004): 22440-8.

Lee, Kyunghye, Eun Hyeon Song, Ho Soo Kim, Jae Hyuk Yoo, Hay Ju Han, Mi Soon Jung, Sang Min Lee, Kyung Eun Kim, Min Chul Kim, Moo Je Cho, und Woo Sik Chung. „Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in Arabidopsis.“ *The Journal of biological chemistry* 283, Nr. 35 (Aug 2008): 23581-8.

Lichty, Jordan J, Joshua L Malecki, Heather D Agnew, Daniel J Michelson-Horowitz, und Song Tan. „Comparison of affinity tags for protein purification.“ *Protein Expression and Purification* 41, Nr. 1 (May 2005): 98-105.

Liu, Yidong, und Shuqun Zhang. „Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis.“ *The Plant cell* 16, Nr. 12 (Dec 2004): 3386-99.

Merkouropoulos, Georgios, Erik Andreasson, Daniel Hess, Thomas Boller, und Scott C Peck. „An Arabidopsis protein phosphorylated in response to microbial elicitation, atPHOS32, is a substrate of map kinases 3 and 6.“ *The Journal of biological chemistry* 283, Nr. 16 (Feb 2008): 10493-9.

Mészáros, Tamás, Anne Helfer, Elizabeth Hatzimasoura, Zoltán Magyar, Liliya Serazetdinova, Gabino Rios, Viola Bardóczy, Markus Teige, Csaba Koncz, Scott C Peck, und László Bögre. „The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48, Nr. 4 (Nov 2006): 485-98.

Miernyk, Jan A, und Jay J Thelen. „Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions.“ *The Plant journal* 53, Nr. 4 (Feb 2008): 597-609.

Miles, Godfrey P, Marcus A Samuel, Yuelin Zhang, und Brian E Ellis. „RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3.“ *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 138, Nr. 2 (Nov 2005): 230-7.

Mishra, Neeti Sanan, Renu Tuteja, und Narendra Tuteja. „Signaling through MAP kinase networks in plants.“ *Archives of biochemistry and biophysics* 452, Nr. 1 (Aug 2006): 55-68.

Moon, Haejeong, Boyoung Lee, Giltsu Choi, Dongjin Shin, D. Theertha Prasad, Oksun Lee, Sang-Soo Kwak, Doh Hoon Kim, Jaesung Nam, Jeongdong Bahk, Jong Chan Hong, Sang Yeol Lee, Moo Je Cho, Chae Oh Lim, und Dae-Jin Yun. „NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, Nr. 1 (Jan 2003): 358-63.

Morsy, Mustafa, Satyanarayana Gouthu, Sandra Orchard, David Thorneycroft, Jeff F. Harper, Ron Mittler, und John C. Cushman. „Charting plant interactomes: possibilities and challenges.“ *Trends in Plant Science* 13, Nr. 4 (Apr 2008): 183-91.

Mueller, Uwe, Konrad Büssow, Anne Diehl, Franz J. Bartl, Frank H. Niesen, Lajos Nyarsik, und Udo Heinemann. „Rapid purification and crystal structure analysis of a small protein carrying two terminal affinity tags.“ *Journal of structural and functional genomics* 4, Nr. 4 (Jan 2003): 217-25.

Munro, S, und H R Pelham. „Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of Drosophila hsp 70.“ *The EMBO Journal* 3, Nr. 13 (Dec 1984): 3087-93.

Nakagami, Hirofumi, Andrea Pitzschke, und Heribert Hirt. „Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling.“ *Trends in Plant Science* 10, Nr. 7 (Jul 2005): 339-46.

Nakagami, Hirofumi, Hanka Soukupová, Adam Schikora, Viktor Zárský, und Heribert Hirt. „A Mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis.“ *The Journal of biological chemistry* 281, Nr. 50 (Dec 2006): 38697-704.

Nesvizhskii, Alexey I, Andrew Keller, Eugene Kolker, und Ruedi Aebersold. „A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.“ *Analytical chemistry* 75, Nr. 17 (Sep 2003): 4646-58.

Nühse, Thomas S, Scott C Peck, Heribert Hirt, und Thomas Boller. „Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6.“ *The Journal of biological chemistry* 275, Nr. 11 (Mar 2000): 7521-6.

Nürnbergger, Thorsten, und Frédéric Brunner. „Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns.“ *Current Opinion in Plant Biology* 5, Nr. 4 (Aug 2002): 318-24.

Parinov, Serguei, Mayalagu Sevugan, De Ye, Wei-Cai Yang, Mande Kumaran, und Venkatesan Sundaresan. „Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in Arabidopsis.“ *The Plant cell* 11, Nr. 12 (Dec 1999): 2263-70.

Park, Sang-Hyun, Ali Zarrinpar, und Wendell A Lim. „Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms.“ *Science (New York, NY)* 299, Nr. 5609 (Feb 2003): 1061-4.

Paul, Anna-Lisa, Li Liu, Scott McClung, Beth Laughner, Sixue Chen, und Robert Ferl. „Comparative Interactomics: Analysis of Arabidopsis 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants.“ *Journal of proteome research* 8 (Feb 2009): 1913-24.

Peng, Zhaohua, Yunping Shen, Suhua Feng, Xiping Wang, Brahma Nanda Chitteti, Richard D. Vierstra, und Xing Wang Deng. „Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo.“ *Current biology : CB* 13, Nr. 13 (Jul 2003): R504-5.

Petersen, M, Peter Brodersen, Henrik Naested, Erik Andreasson, Ursula Lindhart, Bo Johansen, Henrik B. Nielsen, Michelle Lacy, Mark J. Austin, Jane E. Parker, Sashi B. Sharma, Daniel F. Klessig, Rob Martienssen, Ole Mattsson, Anders B. Jensen, und John Mundy. „Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance.“ *Cell* 103, Nr. 7 (Dec 2000): 1111-20.

Popescu, Sorina C, George V. Popescu, Shawn Bachan, Zimei Zhang, Mark Gerstein, Michael Snyder, und Savithramma P. Dinesh-Kumar. „MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays.“ *Genes & development* 23, Nr. 1 (Jan 2009): 80-92.

Puig, Oscar, Friederike Caspary, Guillaume Rigaut, Berthold Rutz, Emmanuelle Bouveret, Elisabeth Bragado-Nilsson, Matthias Wilm, und Bertrand Séraphin. „The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification.“ *Methods* 24, Nr. 3 (Jan 2001): 218-29.

Qi, Yiping, und Fumiaki Katagiri. „Purification of low-abundance Arabidopsis plasma-membrane protein complexes and identification of candidate components.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 57, Nr. 5 (Mar 2009): 932-44.

Qiu, Jin-Long, Lu Zhou, Byung-Wook Yun, Henrik Bjørn Nielsen, Berthe Katrine Fiil, Klaus Petersen, Jim MacKinlay, Gary J. Loake, John Mundy, Peter C. Morris. „Arabidopsis MAP Kinase Kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signalling mediated by MEKK1, MPK4 and MKS1.“ *Plant Physiology* 148, Nr. 1 (Jul 2008a):212-22.

Qiu, Jin-Long, Berthe Katrine Fiil, Klaus Petersen, Henrik Bjørn Nielsen, Christopher J Botanga, Stephan Thorgrimsen, Kristoffer Palma, Maria Cristina Suarez-Rodriguez, Signe Sandbech-Clausen, Jacek Lichota, Peter Brodersen, Klaus D Grasser, Ole Mattsson, Jane Glazebrook, John Mundy, und Morten Petersen. „Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus.“ *The EMBO Journal* 27, Nr. 16 (Aug 2008b): 2214-21.

- Reményi, Attila, Matthew C Good, Roby P Bhattacharyya, und Wendell A Lim. „The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network.“ *Molecular cell* 20, Nr. 6 (Dec 2005): 951-62.
- Reményi, Attila, Matthew C Good, und Wendell A Lim. „Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks.“ *Current opinion in structural biology* 16, Nr. 6 (Dec 2006): 676-85.
- Remmerie, Noor, Luc Roef, Eveline Van De Slijke, Jelle Van Leene, Geert Persiau, Dominique Eeckhout, Hilde Stals, Kris Laukens, Filip Lemièr, Eddy Esmans, Harry Van Onckelen, Dirk Inzé, Geert De Jaeger, und Erwin Witters. „A bioanalytical method for the proteome wide display and analysis of protein complexes from whole plant cell lysates.“ *Proteomics* 9, Nr. 3 (Feb 2009): 598-609.
- Ren, Dongtao, Yidong Liu, Kwang-Yeol Yang, Ling Han, Guohong Mao, Jane Glazebrook, und Shuqun Zhang. „A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, Nr. 14 (Mar 2008): 5638-43.
- Rigaut, Guillaume, Anna Shevchenko, Berthold Rutz, Matthias Wilm, Matthias Mann und Bertrand Séraphin. „A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration.“ *Nature Biotechnology* 17, Nr. 10 (Jan 1999): 1030-2.
- Rivas, Susana, Tina Romeis, und Jonathan D G Jones. „The Cf-9 disease resistance protein is present in an approximately 420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex.“ *The Plant cell* 14, Nr. 3 (Mar 2002): 689-702.
- Rohila, Jai S, Mei Chen, Shuo Chen, Johann Chen, Ronald Cerny, Chris Dardick, Patrick Canlas, Xia Xu, Michael Gribskov, Siddhartha Kanrar, Jian-Kang Zhu, Pamela Ronald, und Michael E Fromm. „Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46, Nr. 1 (Apr 2006): 1-13.
- Rohila, Jai S, Mei Chen, Ronald Cerny, und Michael E Fromm. „Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38, Nr. 1 (Apr 2004): 172-81.
- Rose, Jocelyn K C, Sajid Bashir, James J Giovannoni, Molly M Jahn, und Ramu Subramanian Saravanan. „Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39, Nr. 5 (Sep 2004): 715-33.
- Rubio, Vicente, Yunping Shen, Yusuke Saijo, Yule Liu, Giuliana Gusmaroli, Savithramma P. Dinesh-Kumar, und Xing Wang Deng. „An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41, Nr. 5 (Mar 2005): 767-78.
- Schlichting, Rita. „Isolierung von MAP-Kinase-Proteinkomplexen aus Arabidopsis thaliana.“ *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* (Nov 2007): 133.
- Schopfer, und Brennicke. „Pflanzenphysiologie.“ *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg*, 1999.
- Schwartz, Monica A, und Hiten D Madhani. „Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Annual Review of Genetics* 38 (Jan 2004): 725-48.
- Schweighofer, Alois, Vaiva Kazanaviciute, Elisabeth Scheickl, Markus Teige, Robert Doczi, Heribert Hirt, Manfred Schwanninger, Merijn Kant, Robert Schuurink, Felix Mauch, Antony Buchala, Francesca Cardinale, und Irute Meskiene. „The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis.“ *The Plant cell* 19, Nr. 7 (Jul 2007): 2213-24.

Shao, Feng, Catherine Golstein, Jules Ade, Mark Stoutemyer, Jack E Dixon, und Roger W Innes. „Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector.“ *Science (New York, NY)* 301, Nr. 5637 (Aug 2003): 1230-3.

Sharrocks, Andrew D, Shen-Hsi Yang, und Alex Galanis. „Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases.“ *Trends in Biochemical Sciences* 25, Nr. 9 (Sep 2000): 448-53.

Shaw, Andrey S, und Erin L Filbert. „Scaffold proteins and immune-cell signalling.“ *Nature reviews Immunology* 9, Nr. 1 (Jan 2009): 47-56.

Shevchenko, Anna, Daniel Schaft, Assen Roguev, W W M Pim Pijnappel, A Francis Stewart, und Andrej Shevchenko. „Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1, Nr. 3 (Mar 2002): 204-12.

Skerra, A, und T G Schmidt. „Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins.“ *Methods in enzymology* 326 (Jan 2000): 271-304.

Smith, D B, und K S Johnson. „Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.“ *Gene* 67, Nr. 1 (Jul 1988): 31-40.

Southern. „Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.“ *J Mol Biol* 98, Nr. 3 (1975): 503-17.

Spielau, Claudia. „Grundlagen der Analyse von Proteinkinase-Komplexen mittels Tandem Affinity Purification (TAP) aus transgenen *Arabidopsis thaliana*.“ *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*, (Aug 2004): 72.

Steen, Hanno, und Matthias Mann. „The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, Nr. 9 (Sep 2004): 699-711.

Strohalm, Martin, Martin Hassman, Bedrich Kosata, und Milan Kodíček. „mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis.“ *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 22, Nr. 6 (Jan 2008): 905-8.

Suarez-Rodriguez, Maria Cristina, Lori Adams-Phillips, Yidong Liu, Huachun Wang, Shih-Heng Su, Peter J. Jester, Shuqun Zhang, Andrew F. Bent, und Patrick J. Krysan. „MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants.“ *Plant Physiology* 143, Nr. 2 (Feb 2007): 661-9.

Swiderski, Michal R, und Roger W Innes. „The *Arabidopsis* PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 26, Nr. 1 (Apr 2001): 101-12.

Tada, Yasuomi, Steven H. Spoel, Karolina Pajerowska-Mukhtar, Zhonglin Mou, Junqi Song, Chun Wang, Jianru Zuo, und Xinnian Dong. „Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins.“ *Science (New York, NY)* 321, Nr. 5891 (Aug 2008): 952-6.

Tagwerker, Christian, Karin Flick, Meng Cui, Cortnie Guerrero, Yimeng Dou, Bernhard Auer, Pierre Baldi, Lan Huang, und Peter Kaiser. „A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, Nr. 4 (Apr 2006): 737-48.

Takahashi, Fuminori, Riichiro Yoshida, Kazuya Ichimura, Tsuyoshi Mizoguchi, Shigemi Seo, Masahiro Yonezawa, Kyonoshin Maruyama, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, und Kazuo Shinozaki. „The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis.“ *The Plant cell* 19, Nr. 3 (Mar 2007): 805-18.

Tena, Guillaume, Tsuneaki Asai, Wan-Ling Chiu, und Jen Sheen. „Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades.“ *Current Opinion in Plant Biology* 4, Nr. 5 (Oct 2001): 392-400.

Terpe, K. „Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.“ *Applied microbiology and biotechnology* 60, Nr. 5 (Jan 2003): 523-33.

Thomma, Bart P, Iris AMA Penninckx, Willem F Broekaert, und Bruno PA Cammue. „The complexity of disease signaling in Arabidopsis.“ *Current Opinion in Immunology* 13, Nr. 1 (Feb 2001): 63-8.

Tsunoda, Susan, Jimena Sierralta, und Charles S Zuker. „Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes.“ *Current opinion in genetics & development* 8, Nr. 4 (Aug 1998): 419-22.

Ulm, Roman, Kazuya Ichimura, Tsuyoshi Mizoguchi, Scott C. Peck, Tong Zhu, Xun Wang, Kazuo Shinozaki, und Jerzy Paszkowski. „Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1.“ *The EMBO Journal* 21, Nr. 23 (Dec 2002): 6483-93.

Van Aken, Olivier, Tamara Pecenková, Brigitte van de Cotte, Riet De Rycke, Dominique Eeckhout, Hillel Fromm, Geert De Jaeger, Erwin Witters, Gerrit TS Beemster, Dirk Inzé, und Frank Van Breusegem. „Mitochondrial type-I prohibitins of Arabidopsis thaliana are required for supporting proficient meristem development.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52, Nr. 5 (Dec 2007): 850-64.

Van der Biezen, Erik A, und Jonathan D Jones. „Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept.“ *Trends in Biochemical Sciences* 23, Nr. 12 (Dec 1998): 454-6.

Van Leene, Jelle, Erwin Witters, Dirk Inzé, und Geert De Jaeger. „Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes.“ *Trends in Plant Science* 13, Nr. 10 (Oct 2008): 517-20.

Van Leene, Jelle, Hilde Stals, Dominique Eeckhout, Geert Persiau, Eveline Van De Slijke, Gert Van Isterdael, Annelies De Clercq, Eric Bonnet, Kris Laukens, Noor Remmerie, Kim Henderickx, Thomas De Vijlder, Azmi Abdelkrim, Anne Pharazyn, Harry Van Onckelen, Dirk Inze, Erwin Witters, und Geert De Jaeger. „A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, Nr. 7 (Jul 2007): 1226-38.

Van Wijk, Klaas J. „Challenges and prospects of plant proteomics.“ *Plant Physiology* 126, Nr. 2 (Jun 2001): 501-8.

Veraksa, Alexey, Andreas Bauer, und Spyros Artavanis-Tsakonas. „Analyzing protein complexes in Drosophila with tandem affinity purification-mass spectrometry.“ *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 232, Nr. 3 (Mar 2005): 827-34.

Walter, Michael, Christina Chaban, Katia Schütze, Oliver Batistic, Katrin Weckermann, Christian Näke, Dragica Blazevic, Christopher Grefen, Karin Schumacher, Claudia Oecking, Klaus Harter, und Jörg Kudla. „Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation.“ *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40, Nr. 3 (Nov 2004): 428-38.

Wang, Huachun, Yidong Liu, Kristin Bruffett, Justin Lee, Gerd Hause, John C. Walker und Shuqun Zhang. „Haplo-Insufficiency of MPK3 in MPK6 Mutant Background Uncovers a Novel Function of These Two MAPKs in Arabidopsis Ovule Development.“ *The Plant cell* 20 (Mar 2008): 602-13.

Wang, Huachun, Njabulo Ngwenyama, Yidong Liu, John C Walker, und Shuqun Zhang. „Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis.“ *The Plant cell* 19, Nr. 1 (Jan 2007): 63-73.

Warren, Randall F, Peter M Merritt, Eric Holub, und Roger W Innes. „Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in Arabidopsis.“ *Genetics* 152, Nr. 1 (May 1999): 401-12.

Waugh, David S. „Making the most of affinity tags.“ *Trends in Biotechnology* 23, Nr. 6 (Jun 2005): 316-20.

Werner, Andrea K, Imogen A Sparkes, Tina Romeis, und Claus-Peter Witte. „Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoin amidohydrolases from Arabidopsis and soybean.“ *Plant Physiology* 146, Nr. 2 (Feb 2008): 418-30.

Widjaja, Ivy, Kai Naumann, Udo Roth, Noreen Wolf, David Mackey, Jeffery L. Dangl, Dierk Scheel and Justin Lee. „Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense.“ *PROTEOMICS* 9, Nr. 1 (Jan 2009): 138-47.

Williams, N E. „Immunoprecipitation procedures.“ *Methods in cell biology* 62 (Jan 2000): 449-53.

Witte, Claus-Peter, Laurent D Noël, Janine Gielbert, Jane E Parker, und Tina Romeis. „Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope.“ *Plant molecular biology* 55, Nr. 1 (May 2004): 135-47.

Wodak, Shoshana J, Shuye Pu, James Vlasblom, und Bertrand Séraphin. „Challenges and rewards of interaction proteomics.“ *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, Nr. 1 (Jan 2009): 3-18.

Xi, Jinghui, Xu Wang, Shanyu Li, Xin Zhou, Lin Yue, Jia Fan, und Dongyun Hao. „Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome.“ *Phytochemistry* 67, Nr. 21 (Nov 2006): 2341-8.

Xiang, C, P Han, I Lutziger, K Wang, und D J Oliver. „A mini binary vector series for plant transformation.“ *Plant molecular biology* 40, Nr. 4 (Jul 1999): 711-7.

Xing, Denghui, Hongwei Zhao, und Qingshun Quinn Li. „Arabidopsis CLP1-SIMILAR PROTEIN3, an ortholog of human polyadenylation factor CLP1, functions in gametophyte, embryo, and postembryonic development.“ *Plant Physiology* 148, Nr. 4 (Dec 2008): 2059-69.

Yang, Wei, Hanno Steen, und Michael R Freeman. „Proteomic approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes.“ *Proteomics* 8, Nr. 4 (Feb 2008): 832-51.

Yoo, Sang-Dong, Young-Hee Cho, Guillaume Tena, Yan Xiong, und Jen Sheen. „Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling.“ *Nature* 451, Nr. 7180 (Feb 2008): 789-95.

Zhang, T, Y Liu, T Yang, L Zhang, S Xu, L Xue, L An. „Diverse signals converge at MAPK cascades in plant.“ *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* 44, Nr. 5-6 (Jan 2006): 274-83.

Zhao, Qiao, Jelena Brkljacic, und Iris Meier. „Two distinct interacting classes of nuclear envelope-associated coiled-coil proteins are required for the tissue-specific nuclear envelope targeting of Arabidopsis RanGAP.“ *The Plant cell* 20, Nr. 6 (Jun 2008): 1639-51.

Zhu, Minfeng, Feng Shao, Roger W Innes, Jack E Dixon, und Zhaohui Xu. „The crystal structure of Pseudomonas avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, Nr. 1 (Jan 2004): 302-7.

Ziegler, J, T Vogt, O Miersch, und D Strack. „Concentration of dilute protein solutions prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.“ *Analytical biochemistry* 250, Nr. 2 (Aug 1997): 257-60.

Anhang

Abbildung A-1
BiFC-Analyse der
putativen Interak-
toren (Mikroskopi-
sche Aufnahmen)

Analyse der In-
teraktion zwischen
MPK3- bzw.
MPK6-YFP^N und
den putativen Inter-
aktoren PBS1-
YFP^C, At2g37710-
YFP^C (Rezeptor-
Lectin-Kinase) und
At4g31660-YFP^C
(Transkriptionsfak-
tor der B3-Familie).
Als Kontrolle wurde
die N-terminale
Domäne des YFP
(YFP^N) jeweils mit
den putativen Inter-
aktoren ko-expri-
miert. Die Fluores-
zenz des CFP und
YFP der transfizier-
ten Protoplasten
wurde bei 40facher
Vergrößerung an
einem Fluoreszenz-
Mikroskop aufge-
nommen.

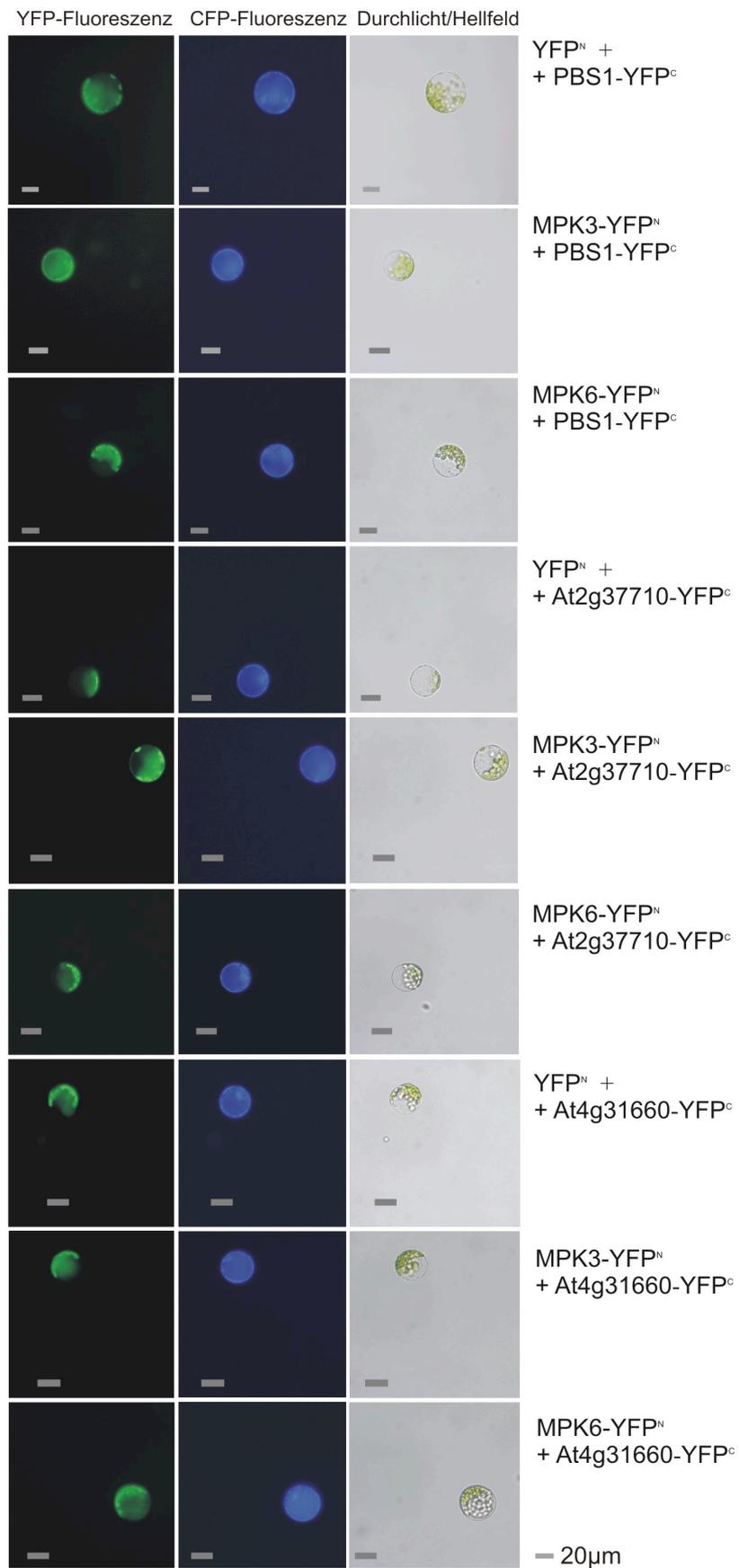
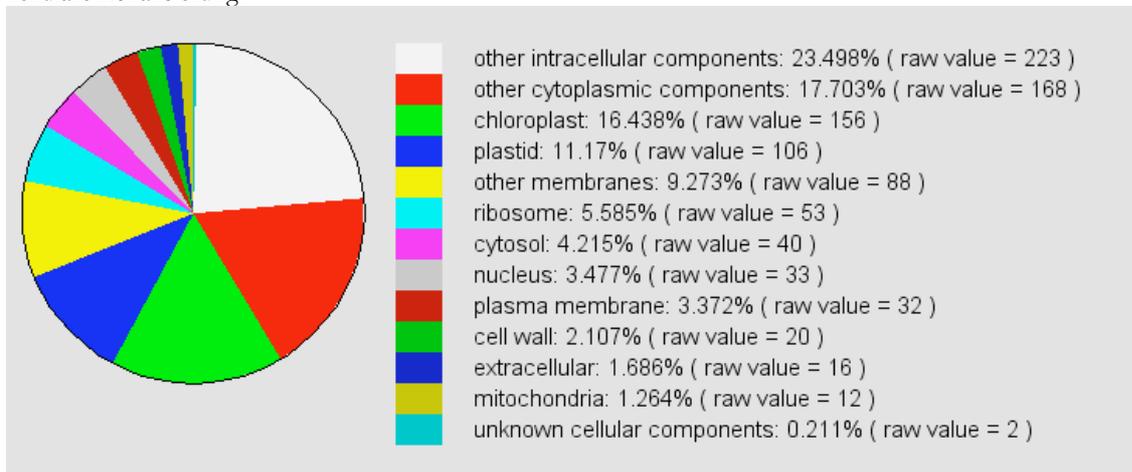


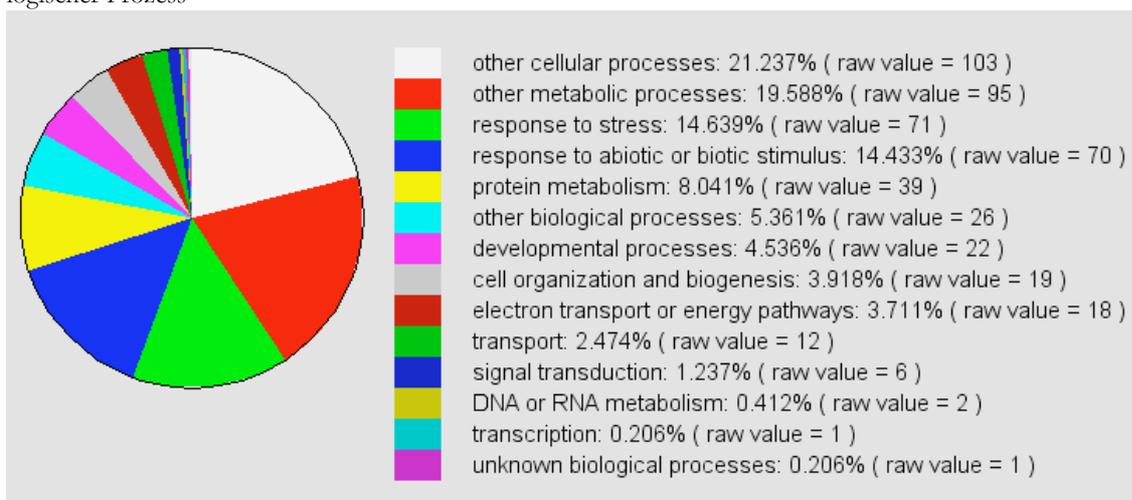
Abbildung A-2 Vergleichende Analyse der biologischen GO (*gene ontology*) Kategorien der identifizierten Proteine aus der Tandem-Affinitätschromatographie.

Die Diagramme repräsentieren den Prozentsatz der Annotierungen der identifizierten Proteine aus der MPK3- und MPK6-TAP Tandem-Affinitätschromatographie in verschiedene biologische GO Kategorien. Die Analyse wurde unter Ausnutzung der Informationen der TAIR Datenbank und der *online* verfügbaren TAIR Software auf www.arabidopsis.org durchgeführt.

(A) Verteilung der nach der Tandem-Affinitätschromatographie identifizierten Proteine in der GO Kategorie zelluläre Lokalisierung



(B) Verteilung der nach der Tandem-Affinitätschromatographie identifizierten Proteine in der GO Kategorie biologischer Prozess



(C) Verteilung der nach der Tandem-Affinitätschromatographie identifizierten Proteine in der GO Kategorie molekulare Funktionen

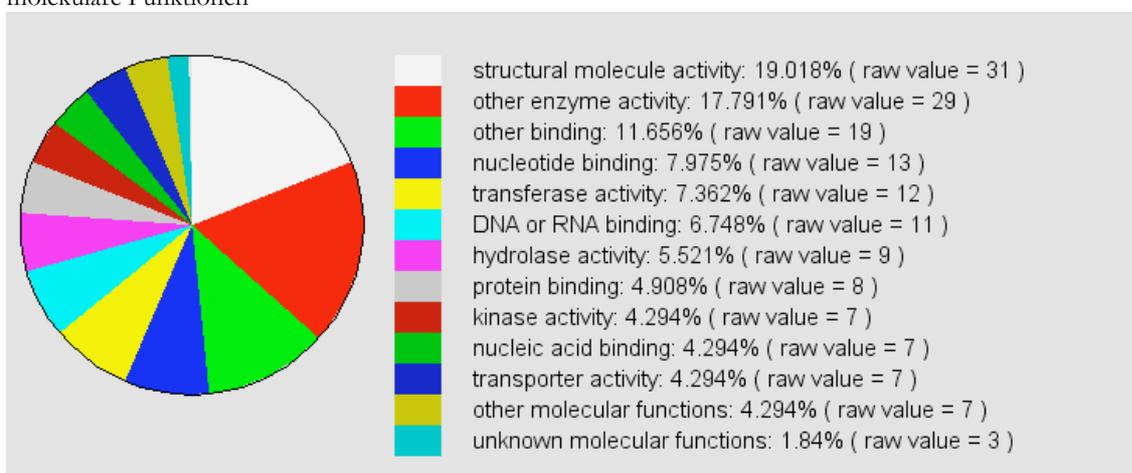
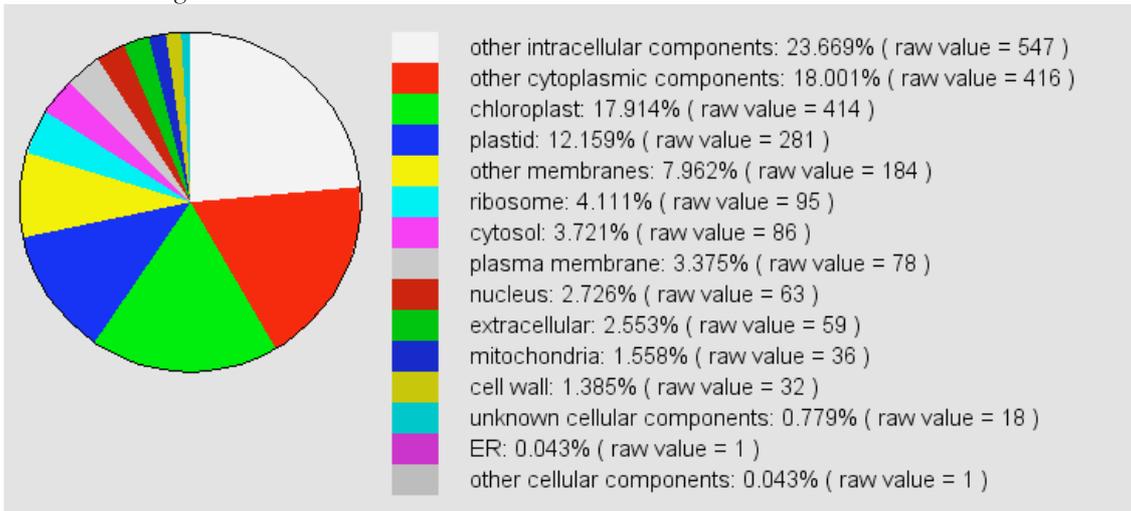
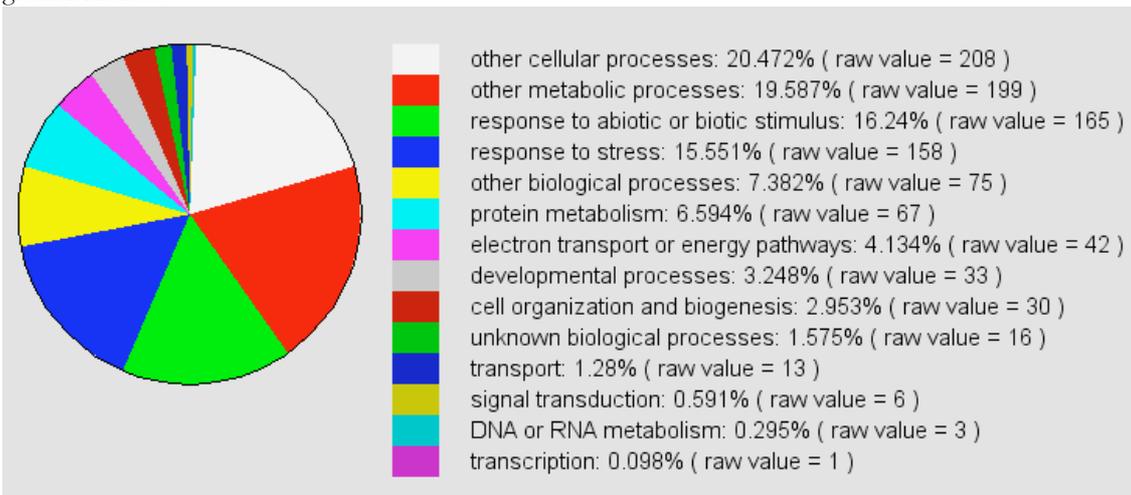


Abbildung A-3 Vergleichende Analyse der biologischen GO (*gene ontology*) Kategorien der identifizierten Proteine aus der MPK6 Strep-Affinitätschromatographie (analog Abbildung A-2).

(A) Verteilung der nach der Strep-Affinitätschromatographie identifizierten Proteine in der GO Kategorie zelluläre Lokalisierung



(B) Verteilung der nach der Strep-Affinitätschromatographie identifizierten Proteine in der GO Kategorie biologischer Prozess



(C) Verteilung der nach der Strep-Affinitätschromatographie identifizierten Proteine in der GO Kategorie molekulare Funktionen

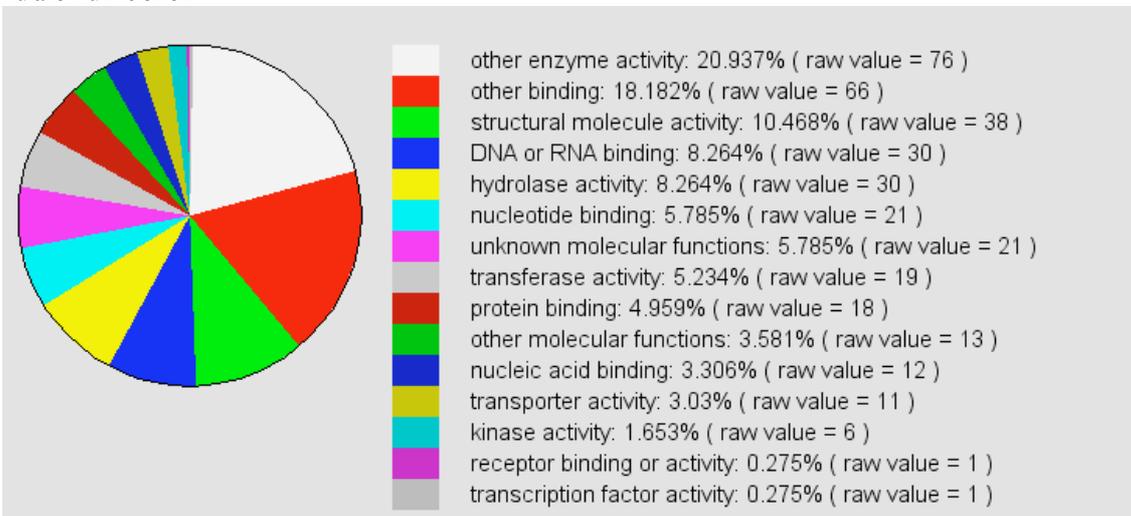


Tabelle A-1 ANOVA (Multiple Range Test für den Anteil der nicht YFP-fluoreszierenden Protoplasten; Methode 95,0% LSD)

<i>Protein-Paar</i>	<i>Replikate</i>	<i>Mittelwert in %</i>	<i>Zuordnung ANOVA</i>	<i>Homogene Gruppe</i>
CFP-YFP	4	0,00	X	A
MPK6-TAP-YFP _n + PRP-YFP _c	3	42,49	X	B
MPK6-TAP-YFP _n + NDPK2-YFP _c	4	52,92	X X	BC
MPK3-TAP-YFP _n + PRP-YFP _c	4	71,73	X X	CD
MPK3-TAP-YFP _n + VIP1-YFP _c	4	72,63	X	D
MPK3-YFP _n + PBS1-YFP _c	4	73,91	X	D
MPK4-TAP-YFP _n + PRP-YFP _c	4	75,37	X	D
MPK3-YFP _n + At2g37710-YFP _c	3	89,33	X X	DE
MPK6-YFP _n + PBS1-YFP _c	3	92,10	X X	DE
TAP-YFP _n + PRP-YFP _c	3	97,14	X	E
YFP _n + YFP _c	3	97,43	X	E
MPK6-YFP _n + At2g37710-YFP _c	3	98,87	X	E
TAP-YFP _n + NDPK2-YFP _c	3	98,94	X	E
MPK6-YFP _n + At4g31660-YFP _c	3	100,00	X	E
MPK3-YFP _n + At4g31660-YFP _c	3	100,00	X	E
YFP _n + At4g31660-YFP _c	3	100,00	X	E
YFP _n + At2g37710-YFP _c	3	100,00	X	E
YFP _n + PBS1-YFP _c	3	100,00	X	E
TAP-YFP _n + VIP1-YFP _c	3	100,00	X	E

Tabelle A-2 Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>T^M (°C)</i>	<i>Gen / Verwendung</i>
EF1A-s	TCA CAT CAA CAT TGT GGT CAT TGG C	61,3	Elongationsfaktor 1 α , konstitutive Kontrolle
EF1A-as	TTG ATC TGG TCA AGA GCC TCA AG	60,6	
AtMPK6Sal	GTC GAC ATG GAC GGT GGT TCA GGT CAA CCG	72,2	MPK6 <i>forward</i>
AtMPK6Afl	ACA TGT ATT GCT GAT ATT CTG GAT TGA AAG	61,3	MPK6 <i>revers</i>
AtMPK4- XhoI.fwd	AAC TCG AGA TGT CGG CGG AGA GTT GTT TCG	69,5	MPK4 <i>forward</i>
AtMPK4- NcoI.rev	TTC CAT GGA CAC TGA GTC TTG AGG ATT GAA C	66,8	MPK4 <i>revers</i>
AtMPK4i-f	ACA TGT AAT GTT CAC TTC TGG	54,0	Intron-Oligonukleotid für KO Kontrolle MPK4
AtMPK4i-r	AGA TGC TGA TGA TTA GTA ACA CG	57,1	
mpk4_Ds3-1a	GGT TCC CGT CCG ATT TCG ACT	61,8	Nachweis des Ds-Elements in <i>mpk4</i> Pflanzen
mpk4_Ds5-1a	ACG GTC GGG AAA CTA GCT CTA C	62,1	(aus Parinov <i>et al.</i> 1999)
TAPrev	ATC AAG CTT CAG GTT GAC TTC C	58,4	TAP-Epitoptag <i>revers</i>
Strep_rev	TTT TTC AAA TGA AGG ATG AGA CCA	55,9	Strep-Tag <i>revers</i>

Tabelle A-2 (Fortsetzung)

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>T^M (°C)</i>	<i>Gen / Verwendung</i>
MPK3 fwd	C ACC ATG AAC ACC GGC GGT	55	(Gateway Klonierung)
MPK4_fwd	C ACC ATG TCG GCG GAG AGT	55	(Gateway Klonierung)
MPK6 fwd	C ACC ATG GAC GGT GGT TCA	53	(Gateway Klonierung)
CACC_TAP- fwd	C ACC ATG GAA AAG AGA AGA TGG	53	TAP-Tag forward und revers (Gateway Klonierung)
TAP_rev+TGA	TCA GGT TGA CTT CCC CGC	53	
TAP_rev-TGA	GGT TGA CTT CCC CGC GGA	55	
At4g31660_fwd	C ACC ATG GCG GAT CCA GTT C	61,4	transkriptioneller Faktor der B3-Familie, 756 bp
At4g31660_rev	GTT TAA ACG TGA CGG AAT CTC	55,9	(Gateway Klonierung)
At2g37710_fwd	C ACC ATG TTC TTG AAG CTT TTA ACC	59,7	Rezeptor-Lectin-Kinase, 2028 bp
At2g37710_rev	TCT CCC GCC AGA AAG TTG	56,0	(Gateway Klonierung)
At5g13160_fwd	C ACC ATG GGT TGT TTC TCG	56,7	PBS1, 1371 bp (Gateway Klonierung)
At5g13160_rev	CCC GGT ACT GTT GCT CTC	58,2	
At5g04400_fwd	C ACC ATG GCT CGC GAC TCC	63,1	NAM-Familie-Protein, 1188 bp
At5g04400_rev	TTT ATG AGG ATG ATC AAT TTT TCT ATC C	57,8	(Gateway Klonierung)

Tabelle A-3 Identifizierungen aus Tandem-Affinitätschromatographie mit und ohne Ammoniumsulfat-Vorfraktionierung (VF) der Proteinextrakte sowie mit eliziertem (flg22) Pflanzenmaterial

<i>AGI Code</i>	<i>MG</i>	<i>EV</i>	<i>MPK3-</i>	<i>MPK6-</i>	<i>EV</i>	<i>MPK3-</i>	<i>MPK6-</i>	<i>EV</i>	<i>MPK3-</i>	<i>MPK6-</i>
		<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>
		<i>pur</i>	<i>pur</i>	<i>pur</i>	<i>+VF</i>	<i>+VF</i>	<i>+VF</i>	<i>flg22</i>	<i>flg22</i>	<i>flg22</i>
ATCG00120.1	55 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT2G39730.2	49 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT4G20360.1	52 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT3G26650.1	42 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT5G50920.1	103 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT1G42970.1	48 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT3G13920.1	47 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT1G07920.1	50 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCG00480.1	54 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT2G33800.1	33 kDa	+	+	-	+	+	+	+	-	+
AT4G04640.1	41 kDa	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AT1G49240.1	42 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT3G43810.1	17 kDa	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AT4G27440.1	43 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ATCG00490.1	53 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT3G14420.1	40 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT1G13440.1	37 kDa	+	+	-	+	+	+	+	+	+
AT5G44340.1	50 kDa	+	+	+	+	+	+	-	-	+
AT1G55490.1	64 kDa	+	+	+	+	+	+	+	-	+
AT3G12780.1	50 kDa	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AT1G04820.1	50 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT5G35630.1	47 kDa	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ATCG00800.1	25 kDa	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AT1G33120.1	22 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT3G22890.1	51 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT3G45640.1	48 kDa	-	+	-	-	+	-	-	+	-
AT1G03630.1	44 kDa	-	-	-	+	+	+	+	-	+
AT2G07698.1	86 kDa	-	+	-	+	+	+	+	-	-
AT3G17390.1	43 kDa	-	+	-	+	+	+	-	-	-
AT1G12900.1	43 kDa	+	+	-	+	-	+	+	+	+
AT3G46780.1	54 kDa	-	-	-	+	+	+	+	-	+
AT5G10360.1	28 kDa	-	-	-	-	-	-	+	+	+
AT3G25920.1	30 kDa	-	-	-	-	-	-	+	+	+
AT5G30510.1	45 kDa	-	+	-	+	+	+	-	-	-
AT1G20010.1	50 kDa	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AT3G60750.1	80 kDa	+	+	-	+	+	+	-	-	-
AT1G20620.1	57 kDa	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AT2G39800.1	78 kDa	-	-	+	+	+	+	-	-	-
AT1G10630.1	21 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT5G17920.1	84 kDa	+	-	-	-	-	+	+	+	+
AT4G34620.1	13 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT5G56030.1	80 kDa	-	+	+	-	-	-	+	+	-
AT1G65960.1	42 kDa	-	-	-	-	+	+	-	+	-
AT1G23310.1	53 kDa	+	-	+	+	+	+	-	-	-
AT4G10340.1	30 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ATCG00470.1	14 kDa	+	-	+	+	+	+	-	-	-
AT4G13940.1	53 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT4G11150.1	26 kDa	-	-	-	+	+	+	+	-	-

Tabelle A-3 (Fortsetzung)

<i>AGI Code</i>	<i>MG</i>	<i>EV</i>	<i>MPK3-</i>	<i>MPK6-</i>	<i>EV</i>	<i>MPK3-</i>	<i>MPK6-</i>	<i>EV</i>	<i>MPK3-</i>	<i>MPK6-</i>
		<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>	<i>TAP</i>
		<i>pur</i>	<i>pur</i>	<i>pur</i>	<i>+VF</i>	<i>+VF</i>	<i>+VF</i>	<i>flg22</i>	<i>flg22</i>	<i>flg22</i>
AT1G05190.1	25 kDa	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AT1G61520.1	29 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT2G21660.1	17 kDa	-	-	-	-	-	-	+	+	-
AT1G32060.1	44 kDa	-	-	-	-	+	+	-	-	-
AT3G47470.1	28 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT1G67090.1	20 kDa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AT3G25520.1	34 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AT5G62690.1	51 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AT5G48790.1	36 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ATCG00540.1	35 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	+
AT2G27710.1	11 kDa	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ATCG00830.1	30 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	+
AT4G24770.1	36 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AT5G09810.1	42 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT3G13920.1	47 kDa	+	+	+	-	-	-	+	+	+
ATCG00770.1	15 kDa	-	-	-	-	+	+	-	-	-
AT1G31330.1	24 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT4G31700.1	28 kDa	-	-	-	-	-	-	+	+	+
AT4G39260.1	17 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AT3G27830.1	20 kDa	-	-	-	+	+	+	-	-	-
AT1G42550.1	79 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AT2G43790.1	50 kDa	-	-	+	-	-	+	-	-	+
AT5G56710.1	14 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT5G02870.1	45 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	+
AT5G27770.1	14 kDa	-	-	-	-	-	-	-	+	+
AT1G04480.1	15 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT1G56070.1	94 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT1G48830.1	22 kDa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AT1G76180.1	21 kDa	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AT3G56340.1	15 kDa	-	-	-	-	-	-	+	+	-
AT2G19730.1	16 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT2G33040.1	35 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT3G05560.1	14 kDa	-	-	-	-	-	-	+	+	-
AT1G54270.1	47 kDa	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AT2G27720.1	11 kDa	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AT5G56010.1	80 kDa	-	+	+	-	-	-	+	+	+
AT3G24430.1	58 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT3G14415.1	40 kDa	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AT3G27160.1	21 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
AT3G54890.1	26 kDa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AT1G16720.1	66 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AT1G11650.2	44 kDa	-	-	-	+	-	+	-	-	-
AT4G18100.1	16 kDa	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabelle A-4 Identifizierungen aus StrepII-Affinitätschromatographie mit und ohne PEG-Vorfraktionierung (VF) mit nicht-eliziertem Pflanzenmaterial

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>pur</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>pur</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>+ VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>+VF</i>
AT4G24770.1	36 kDa	+	+	-	+
ATCG00490.1	53 kDa	+	+	+	+
AT1G76180.1	21 kDa	+	+	-	+
ATCG00480.1	54 kDa	+	+	+	+
AT3G50820.1	35 kDa	+	+	+	+
AT3G12780.1	50 kDa	+	-	+	+
ATCG00120.1	55 kDa	+	+	+	+
AT1G20450.1	30 kDa	+	+	-	-
AT1G20440.1	30 kDa	+	+	-	-
AT5G17920.1	84 kDa	-	-	+	+
AT5G35360.1	58 kDa	+	+	-	-
AT1G06680.1	28 kDa	+	-	+	+
AT4G10340.1	30 kDa	+	+	+	+
AT2G39730.1	52 kDa	+	-	+	+
AT5G16390.1	30 kDa	+	+	-	+
AT1G49240.1	42 kDa	-	-	+	+
AT3G60750.1	80 kDa	-	-	+	+
AT1G29910.1	28 kDa	+	+	+	-
AT3G01500.1	30 kDa	-	-	+	+
AT1G67090.1	20 kDa	+	+	+	+
AT4G38970.1	43 kDa	+	-	+	+
AT2G27710.1	11 kDa	+	+	-	-
AT3G14210.1	44 kDa	+	+	-	-
AT2G42530.1	15 kDa	+	-	+	+
AT3G27830.1	20 kDa	+	+	+	+
AT2G37220.1	31 kDa	+	+	-	+
AT3G12390.1	22 kDa	+	+	-	-
ATCG00280.1	52 kDa	+	+	+	+
AT4G21280.1	24 kDa	+	-	+	+
AT2G21660.1	17 kDa	+	+	-	-
AT3G55800.1	42 kDa	-	-	+	+
AT1G31330.1	24 kDa	+	+	+	+
ATCG00680.1	56 kDa	+	+	+	+
AT4G20360.1	52 kDa	+	-	-	+
AT5G22880.1	16 kDa	+	+	-	-
AT3G15730.1	92 kDa	+	+	-	-
AT3G52150.1	28 kDa	+	+	-	+
AT4G05180.1	25 kDa	+	-	+	+
AT2G42540.1	13 kDa	+	-	+	+
AT3G56130.1	30 kDa	-	+	-	-
AT3G05900.1	73 kDa	-	-	-	+
AT4G13940.1	53 kDa	-	-	+	-
AT1G61520.1	29 kDa	+	-	+	+
AT3G47470.1	28 kDa	-	-	-	+
AT4G02770.1	23 kDa	+	+	-	-
AT1G07660.1	11 kDa	+	+	-	-
ATCG00270.1	40 kDa	+	+	+	-
AT5G15970.1	7 kDa	+	-	+	+
AT3G52960.1	25 kDa	-	-	+	+

Tabelle A-4 (Fortsetzung)

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>pur</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>pur</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>+ VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>+VF</i>
AT1G62480.1	17 kDa	-	-	+	+
AT1G43170.1	45 kDa	+	+	-	-
AT1G52670.1	30 kDa	+	+	-	-
AT4G28750.1	15 kDa	+	+	+	+
AT1G13930.1	16 kDa	+	-	+	+
AT3G53430.1	18 kDa	+	+	-	-
AT3G04790.1	29 kDa	-	-	+	+
AT4G02520.1	24 kDa	-	-	+	+
AT5G47210.1	38 kDa	+	+	-	-
AT5G66570.1	35 kDa	+	-	-	+
AT5G38410.1	20 kDa	+	-	-	+
AT4G32260.1	24 kDa	-	+	+	-
AT3G26650.1	42 kDa	+	-	-	+
AT1G23310.1	53 kDa	-	-	+	+
AT3G17390.1	43 kDa	-	-	+	+
AT1G15820.1	28 kDa	+	+	+	+
ATCG00020.1	39 kDa	+	-	+	-
AT3G55440.1	27 kDa	-	-	+	+
AT2G19480.1	44 kDa	+	+	-	-
AT4G10480.1	23 kDa	-	+	-	-
AT5G01530.1	31 kDa	+	-	-	-
AT2G21170.1	33 kDa	-	-	+	+
AT2G43790.1	50 kDa	-	-	+	-
AT1G32470.1	18 kDa	-	-	+	+
AT4G20260.1	25 kDa	-	-	-	+
AT3G62030.1	28 kDa	-	-	+	+
AT1G04410.1	36 kDa	-	-	+	-
AT4G04640.1	41 kDa	-	-	+	-
AT1G17880.1	18 kDa	-	+	-	-
AT3G09200.1	34 kDa	+	+	-	-
AT1G01100.1	11 kDa	+	-	-	-
AT2G27720.1	11 kDa	+	-	-	-
AT1G31812.1	10 kDa	-	-	+	+
AT3G46780.1	54 kDa	+	-	-	-
AT4G09650.1	26 kDa	+	-	+	-
AT3G01390.1	12 kDa	-	+	-	-
AT3G11510.1	16 kDa	+	+	-	-
AT5G20720.1	27 kDa	+	-	-	+
AT1G07890.1	28 kDa	-	-	+	-
AT4G39260.1	17 kDa	+	+	-	-
AT5G54270.1	29 kDa	+	-	-	-
AT1G74560.1	29 kDa	+	+	-	-
ATCG00340.1	82 kDa	+	-	-	-
AT1G11860.1	44 kDa	-	-	-	+
AT1G56340.1	49 kDa	-	+	-	-
AT2G36530.1	48 kDa	-	-	+	-
AT2G44920.2	24 kDa	-	-	-	+
AT5G02500.1	71 kDa	+	+	-	-
AT2G05070.1	29 kDa	+	-	-	-

Tabelle A-4 (Fortsetzung)

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>pur</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>pur</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>+ VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>+VF</i>
AT3G11630.1	29 kDa	-	-	+	-
AT1G74050.1	26 kDa	+	+	-	-
AT2G30860.1	24 kDa	-	-	+	-
AT3G48730.1	50 kDa	-	-	+	-
AT3G53460.1	36 kDa	+	+	-	-
AT4G31700.1	28 kDa	+	-	-	-
AT5G02870.1	45 kDa	+	-	-	-
AT5G12140.1	11 kDa	-	-	-	+
AT1G27400.1	20 kDa	+	+	-	-
AT5G56030.1	80 kDa	+	-	-	-
AT5G53490.1	26 kDa	-	-	-	+
AT4G02530.1	24 kDa	-	-	-	+
AT5G54770.1	37 kDa	-	-	+	-
AT2G37660.1	35 kDa	-	-	+	-
AT3G15360.1	21 kDa	-	-	+	+
AT3G25520.1	34 kDa	+	+	-	-
AT3G22230.1	16 kDa	+	-	-	-
AT4G16720.1	24 kDa	+	-	-	-
AT5G09810.1	42 kDa	-	-	-	+
AT1G16880.1	31 kDa	-	-	-	+
AT3G52880.1	46 kDa	-	-	+	-
AT2G28190.1	22 kDa	-	-	-	+
AT1G72370.1	32 kDa	+	-	-	-
AT1G32060.1	44 kDa	-	-	-	+
AT5G42980.1	13 kDa	-	-	-	+
AT5G14740.2	28 kDa	-	-	+	+
AT2G24940.1	11 kDa	-	-	+	+
AT2G43560.1	24 kDa	-	-	+	-
AT1G31340.1	17 kDa	-	-	-	+
AT2G17360.1	30 kDa	+	-	-	-
AT1G48920.1	59 kDa	-	+	-	-
AT5G26000.1	61 kDa	-	-	-	+
AT3G17210.1	12 kDa	-	-	-	+
AT3G09820.1	38 kDa	-	-	+	-
AT5G20290.1	25 kDa	+	-	-	-
AT5G09650.1	33 kDa	-	-	+	-
AT1G79550.1	42 kDa	-	-	+	-
AT1G02780.1	25 kDa	+	-	-	-
AT5G36700.1	40 kDa	-	-	+	-
AT5G44020.1	31 kDa	+	-	-	-
AT3G49010.1	24 kDa	+	-	-	-
AT2G43750.1	42 kDa	-	-	+	-
AT1G53240.1	36 kDa	-	-	+	-
AT4G14880.1	34 kDa	-	-	+	-
AT1G23740.1	41 kDa	-	-	+	-
AT1G19570.1	24 kDa	-	-	+	-
AT1G69620.1	14 kDa	+	-	-	-
AT2G42740.1	21 kDa	+	-	-	-
AT4G02510.1	161 kDa	-	+	-	-

Tabelle A-4 (Fortsetzung)

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>pur</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>pur</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>+ VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>+VF</i>
AT5G47700.1	11 kDa	+	-	-	-
AT1G73230.1	18 kDa	-	+	-	-
AT3G54050.1	45 kDa	-	-	-	+
AT2G21330.1	43 kDa	-	-	+	+
AT3G56240.1	13 kDa	-	-	-	+
AT1G14320.1	25 kDa	+	-	-	-
AT3G52930.1	39 kDa	-	-	+	-
AT5G02450.1	12 kDa	+	-	-	-
AT3G20390.1	20 kDa	-	-	+	-
AT3G26060.1	24 kDa	-	-	-	+
AT5G15530.1	27 kDa	-	+	-	-
AT1G08830.1	15 kDa	-	-	-	+
AT2G40510.1	15 kDa	-	+	-	-
AT1G42970.1	48 kDa	-	-	-	+
AT3G49470.1	24 kDa	-	+	-	-
AT3G05590.1	21 kDa	+	-	-	-
AT3G58610.1	64 kDa	-	-	+	-
AT2G47730.1	29 kDa	-	-	+	-
AT4G22670.1	47 kDa	-	+	-	-
AT3G16420.1	32 kDa	-	+	-	-
AT2G13360.1	44 kDa	-	-	+	-
AT2G34480.1	21 kDa	+	-	-	-
AT5G51720.1	12 kDa	-	-	-	+
ATCG00540.1	35 kDa	-	-	-	+
AT1G07320.1	31 kDa	-	+	-	-
AT3G63190.1	30 kDa	-	-	-	+
AT4G27520.1	35 kDa	-	-	-	+
AT4G31990.1	50 kDa	-	-	+	-
AT4G37300.1	19 kDa	-	-	-	+

Tabelle A-5 Identifizierungen aus StrepII-Affinitätschromatographie mit und ohne PEG-Vorfraktionierung (VF) mit eliziertem (flg22) Pflanzenmaterial

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>flg22</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>flg22</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>flg22 + VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>flg22 + VF</i>
ATCG00120.1	55 kDa	+	+	+	+
ATCG00480.1	54 kDa	+	+	+	+
ATCG00490.1	53 kDa	+	+	+	+
AT5G35360.1	58 kDa	+	+	-	-
AT1G36160.1	251 kDa	+	+	-	-
AT5G16390.1	30 kDa	+	+	+	+
AT2G39730.2	49 kDa	+	+	+	+
AT1G49240.1	42 kDa	-	-	+	+
AT3G14210.1	44 kDa	+	+	+	+
AT1G06680.1	28 kDa	+	+	+	+
AT4G20360.1	52 kDa	-	+	+	+
AT3G12780.1	50 kDa	+	+	+	+
AT5G66570.1	35 kDa	+	+	+	+
AT3G60750.1	80 kDa	-	-	+	+
AT1G42970.1	48 kDa	+	-	+	+
AT5G54770.1	37 kDa	-	-	+	+
AT4G05180.1	25 kDa	+	+	+	+
AT2G21660.1	17 kDa	+	+	-	-
AT2G43790.1	45 kDa	-	+	-	+
AT4G21280.1	24 kDa	+	+	+	+
AT3G56130.1	30 kDa	+	+	-	-
AT1G13440.1	37 kDa	-	-	+	+
AT5G02500.1	71 kDa	-	+	-	+
AT3G54050.1	45 kDa	-	-	+	+
ATCG00680.1	56 kDa	-	-	+	+
AT4G32260.1	24 kDa	-	-	+	+
AT5G38410.1	20 kDa	-	-	+	-
AT2G37220.1	31 kDa	+	+	+	+
AT5G47210.1	38 kDa	-	+	-	-
AT4G28750.1	15 kDa	+	+	+	+
AT4G38970.1	43 kDa	-	-	+	+
ATCG00280.1	52 kDa	-	+	+	+
AT4G39260.1	17 kDa	-	+	-	-
AT1G07920.1	50 kDa	-	+	+	+
AT2G42540.1	13 kDa	-	-	+	+
AT1G09340.1	43 kDa	-	-	+	+
AT1G52670.1	30 kDa	+	+	-	-
AT1G15820.1	28 kDa	+	+	+	+
AT1G13930.1	16 kDa	-	-	+	+
AT3G53460.1	36 kDa	-	+	-	+
AT5G04140.1	177 kDa	-	-	+	+
ATCG00270.1	40 kDa	+	+	+	+
AT1G03130.1	22 kDa	-	-	+	+
AT5G35630.1	47 kDa	-	-	+	+
AT4G24280.1	77 kDa	-	-	+	+
AT1G29910.1	28 kDa	-	-	+	-
AT5G17920.1	84 kDa	-	-	-	+
ATCG00130.1	21 kDa	-	-	+	+
AT1G11860.1	44 kDa	-	-	+	+

Tabelle A-5 (Fortsetzung)

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>flg22</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>flg22</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>flg22 + VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>flg22 +VF</i>
AT2G07698.1	86 kDa	-	-	+	+
AT4G10340.1	30 kDa	-	-	+	+
AT1G04820.1	50 kDa	-	-	+	+
AT3G26650.1	42 kDa	-	-	+	+
AT3G52150.1	28 kDa	+	+	-	-
ATCG00470.1	14 kDa	-	-	-	+
AT4G13940.1	53 kDa	-	-	-	+
AT1G61520.1	29 kDa	-	-	+	+
ATCG00540.1	35 kDa	-	-	+	+
AT5G26742.1	81 kDa	-	+	-	-
AT1G55490.1	64 kDa	-	-	+	+
AT2G42530.1	15 kDa	-	-	-	+
AT3G14067.1	82 kDa	-	-	+	+
AT1G32060.1	44 kDa	-	-	+	+
AT2G43030.1	29 kDa	+	-	-	-
AT5G09810.1	42 kDa	-	-	-	+
ATCG00020.1	39 kDa	-	-	+	-
AT1G68560.1	102 kDa	-	+	-	-
AT1G27090.1	46 kDa	-	+	-	-
AT3G11510.1	16 kDa	-	+	-	-
AT1G67090.1	20 kDa	-	-	+	-
AT2G05070.1	29 kDa	-	-	-	+
AT3G27830.1	20 kDa	-	-	+	-
AT3G47070.1	11 kDa	-	+	-	-
AT5G09660.1	37 kDa	-	-	+	-
AT5G14740.1	37 kDa	-	-	+	+
AT3G45980.1	16 kDa	-	+	-	-
AT5G02530.1	31 kDa	-	+	-	-
AT1G31330.1	24 kDa	-	-	+	-
AT5G52470.1	33 kDa	-	+	-	-
AT3G54890.1	26 kDa	-	-	-	+
AT2G28000.1	62 kDa	-	-	+	-
AT4G04640.1	41 kDa	-	-	+	-
AT5G23120.1	44 kDa	-	-	+	+
AT3G46780.1	54 kDa	-	+	-	-
AT3G14415.1	40 kDa	-	-	+	-
AT3G04790.1	29 kDa	-	-	-	+
AT3G47470.1	28 kDa	-	-	+	-
AT1G21500.1	13 kDa	-	+	-	-
AT1G29250.1	15 kDa	-	+	-	-
AT4G27440.1	43 kDa	-	-	+	+
AT5G08670.1	60 kDa	-	-	+	-
AT1G43670.1	37 kDa	-	-	-	+
AT5G59950.1	26 kDa	-	+	-	-
AT1G35720.1	36 kDa	-	-	-	+
AT1G26110.1	64 kDa	-	+	-	-
AT5G17710.1	35 kDa	-	-	-	+
AT2G40510.1	15 kDa	-	+	-	-
AT2G21330.1	43 kDa	-	-	-	+
AT1G15690.1	81 kDa	-	-	+	-

Tabelle A-5 (Fortsetzung)

<i>AGI code</i>	<i>MG</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>flg22</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>flg22</i>	<i>mpk6 (Kontrolle)</i> <i>flg22 + VF</i>	<i>MPK6-strepII</i> <i>flg22 + VF</i>
AT4G17520.1	39 kDa	-	+	-	-
AT4G03280.1	24 kDa	-	-	-	+
AT1G52000.1	74 kDa	-	+	-	-
AT4G31700.1	28 kDa	-	+	-	-
AT3G52930.1	39 kDa	-	-	-	+
AT3G14310.1	64 kDa	-	+	-	-
AT1G54270.1	47 kDa	-	-	+	-
AT3G53430.1	18 kDa	-	+	-	-
AT4G16830.1	37 kDa	-	+	-	-
AT1G78830.1	50 kDa	-	+	-	-
AT3G55800.1	42 kDa	-	-	+	-
AT4G22890.1	36 kDa	-	-	+	-
AT1G08880.1	15 kDa	-	+	-	-
AT3G26420.1	27 kDa	-	+	-	-
AT3G53020.1	19 kDa	-	+	-	-
AT2G04520.1	17 kDa	-	+	-	-
AT1G03090.2	80 kDa	-	+	-	-
AT1G04410.1	36 kDa	-	-	-	+
AT2G34040.1	62 kDa	-	+	-	-
AT4G34670.1	30 kDa	-	+	-	-
AT5G27770.1	14 kDa	-	+	-	-
AT3G05560.1	14 kDa	-	+	-	-
AT2G42520.1	68 kDa	-	+	-	-

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dierk Scheel für die Vergabe des Themas, die Betreuung, anregende Diskussionen und die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Den Gutachtern danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Dr. Justin Lee und der Arbeitsgruppe *MAPK Signalling* danke ich für die fortwährende Unterstützung und die Diskussionsbereitschaft. Weiterhin bin ich der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie im IPB für das freundliche Arbeitsklima im Großraumlabor dankbar.

Dr. Kai Naumann, Dr. Jana Neumerkel, Dr. Ivy Widjaja und Ulrike Bettmann danke ich für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Analysen und deren Auswertung. Christina Gericke danke ich für fleißige Mithilfe als Hilfwissenschaftlerin.

Meiner Familie, meinem lieben Ehemann Thomas und meinen geduldigen Freunden, speziell Herby, danke ich für die Unterstützung und die wunderschöne Zeit zusammen.

BILDUNGSGANG

Claudia Spielau

Geboren am 31. August 1980 in Dessau

Verheiratet

- 10/2004 – 03/2009 Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
- Wissenschaftliche Mitarbeiterin im SFB648
Promotion zum Thema: Isolierung pathogen-induzierter MAP
Kinase-Signalkomplexe aus *Arabidopsis thaliana*
Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.
- 10/1999 – 09/2004 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
- Studium der Biochemie
Vertiefungsrichtungen Protein-Chemie und Pflanzen-Genetik
Diplomarbeit zum Thema: Grundlagen der Analyse von
Proteinkinase-Komplexen mittels *Tandem Affinity Purification* (TAP)
aus transgenen *Arabidopsis thaliana*
Abschluss: Diplom-Biochemie
- 09/1991 – 07/1999 Fürst-Franz-Gymnasium, Dessau
Abschluss: Abitur
- 09/1987 – 08/1991 Friedensschule (Grundschule), Dessau

PUBLIKATIONEN

Poster: MAP Kinase cascades in plant defense (Bethke, G., Feilner, T., Kersten, B., Ranf, S., Schlichting, R., Spielau, C., Uhrig, J., Unthan, T., Lee, J. and Scheel, D.)
International Meeting „Communication in Plants and their Response to the Environment“ of
the collaborative research center SFB 648
Halle (Saale), Germany, May 10-12, 2007

Poster: Tandem Affinity Purification of MAP kinase complexes involved in defence signalling (Spielau, C., Naumann, K., Schlichting, R., Lee, J., Scheel, D.)
19th International Conference on Arabidopsis Research
Montréal, Canada, July 23-27, 2008

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht hat.

Halle (Saale), im September 2009

Claudia Spielau