

Die Auffindung neuer Bindepartner pflanzlicher G α -Proteine durch genetische, zellbiologische und biochemische Methoden

DISSERTATION

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 Carolin Wolf
geb. am: 28. Juli 1980 in: Bautzen

Gutachter /in:

1. Herr Prof. Werner Roos
2. Frau Prof. Renate Ulbrich-Hofmann
3. Herr Prof. Klaus Harter

Halle (Saale), 26. Januar 2011

„Je mehr man schon weiß, je mehr hat man noch zu lernen. Mit dem Wissen nimmt das Nichtwissen in gleichem Grade zu, oder vielmehr das Wissen des Nichtwissens.“

Friedrich Schlegel

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	VII
1 EINLEITUNG	9
1.1 G-Protein-vermittelte Signaltransduktion	10
1.1.1 Plasmamembran-Rezeptoren	10
1.1.2 Heterotrimeres G-Protein	12
1.1.2.1 Basisinformationen tierischer G-Proteine	12
1.1.2.2 Struktur pflanzlicher G-Proteine	14
1.1.2.3 Biologische Funktion pflanzlicher G-Proteine	15
1.1.3 Phospholipase A ₂ – ein Target von G α	18
1.2 Ein genetisches Testsystem für Protein-Protein-Interaktionen: das mating-based Split-Ubiquitin System (mbSUS)	21
1.3 Zielstellung der Arbeit	26
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Chemikalien	27
2.2 Geräte	27
2.3 Verbrauchsmaterialien	28
2.4 Kitsysteme	29
2.5 Enzyme, Polymerasen	29
2.6 DNA-Fragmente	30
2.7 Oligonukleotide	30
2.8 Plasmide	31
2.9 Antikörper	32
2.10 Mikroorganismen	32
2.10.1 <i>Escherichia coli</i>	32
2.10.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.11 Nährmedien	33
2.12 Zellkultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.13 Molekularbiologische Methoden	35
2.13.1 Polymerase-Kettenreaktion	35
2.13.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	36
2.13.3 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	36

2.13.4	Ligation	36
2.13.5	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.13.5.1	Auftrennung von DNA	37
2.13.5.2	Auftrennung von RNA	38
2.13.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.13.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	39
2.13.8	Klonierung in pCR8 für Sequenzierung	39
2.13.9	Gateway Klonierung	40
2.13.10	DNA-Sequenzierung	41
2.14	Herstellung einer cDNA-Bank von <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
2.14.1	RNA-Isolierung	41
2.14.2	mRNA-Isolierung	42
2.14.3	CloneMiner cDNA Library Construction	42
2.15	Herstellung einer cDNA-Expressionsbank von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Eschscholzia californica</i>	44
2.16	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	44
2.16.1	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	44
2.16.2	Elektroporation	45
2.16.3	Herstellung hitzekompeter <i>E. coli</i> -Zellen	45
2.16.4	Hitzeschock	46
2.17	Plasmid-Isolierung	46
2.17.1	aus <i>E. coli</i> mittels Alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979)	46
2.17.2	aus <i>E. coli</i> mittels Wizard Plus SV Minipreps	47
2.17.3	aus <i>E. coli</i> mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit	48
2.17.4	aus <i>S. cerevisiae</i> mittels der „Lazy bones“ Methode (verändert nach Kaiser <i>et al.</i> , 1994)	48
2.18	Proteinüberexpression und Aufreinigung	49
2.19	Proteinextrakte von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Volland <i>et al.</i> , 1994)	50
2.20	Fraktionierung pflanzlicher Zellen	50
2.20.1	Zellaufschluss und fraktionierende Zentrifugation	50
2.20.2	Anreicherung der Plasmamembran durch Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System	51
2.21	Biochemische Methoden	52
2.21.1	Proteinbestimmung	52
2.21.2	Co-Immunpräzipitation	53

2.21.3	Proteinfällung	54
2.21.4	Diskontinuierliche SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)	54
2.21.5	SYPRO Ruby Proteinfärbung in SDS–Gelen	56
2.21.6	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	56
2.21.7	Semidry–Blotting	56
2.21.8	Fast Green Proteinfärbung auf Nitrocellulosemembranen	57
2.21.9	Immunologischer Nachweis	57
2.21.10	Ni Sepharose High Performance Bindungsassay	58
2.21.11	ELISA	59
2.22	Messung der Phospholipase A ₂ –Aktivität	60
2.23	mating–based Split–Ubiquitin System „mbSUS“ (Obrdlik <i>et al.</i> , 2004)	61
2.23.1	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels der Lithium–Acetat–Methode (verändert nach Schiestl und Gietz, 1989) ..	61
2.23.2	Mating und Interaktionstests	62
2.23.3	X–Gal Assay	63
2.23.4	Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion	64
3	ERGEBNISSE	65
3.1	Phospholipase A ₂ als ein Interaktionspartner von G α	65
3.1.1	PLA ₂ –Aktivität in der Plasmamembran	65
3.1.2	Aktivierung der PLA ₂ durch GTP	67
3.1.3	G α Antikörper beeinflusst PLA ₂ –Aktivität	69
3.2	Identifizierung von G α –Targets mit Hilfe der Co–Immunpräzipitation	70
3.3	Identifizierung von G α –Targets mit Hilfe des mating–based Split–Ubiquitin Systems	73
3.3.1	Überprüfung des Systems auf Funktionalität	73
3.3.2	Suche nach Bindungspartnern von G α in cDNA–Expressions– banken (<i>Arabidopsis</i> und <i>Eschscholzia</i>)	75
3.3.2.1	Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion	76
3.3.2.2	Validierungen der bisherigen Ergebnisse	80
3.3.2.3	Erhöhungen der Stringenz der G α –Protein–Interaktion	82
3.3.3	Suche nach PLA ₂ –Proteinen als potentielle Interaktoren von G α	95
3.3.3.1	Suche nach PLA ₂ –Genen	95
3.3.3.2	Test möglicher PLA ₂ –Proteine auf Bindepartner von G α mit Hilfe des mating–based Split–Ubiquitin Systems	97

4 DISKUSSION	99
4.1 Die Kontrolle der Stringenz des mating-based Split-Ubiquitin Systems	99
4.2 Bindung von genregulatorischen Proteinen – ein neuer Wirkmechanismus von G α ?	100
4.3 Spezies-spezifischer Unterschied der Bindungseigenschaften von G α	102
4.4 PLA ₂ – Target von G α	104
4.5 Ausblick	106
5 ANHANG	107
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	CXVIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	CXXI
TABELLENVERZEICHNIS	CXXIII
ANHANGVERZEICHNIS	CXXIV
LITERATURVERZEICHNIS	CXXV

ZUSAMMENFASSUNG

1. Heterotrimere G-Proteine sind evolutionär konservierte Module der Signaltransduktion. Obwohl Pflanzen nur eine geringe Zahl der einzelnen Untereinheiten besitzen, üben diese ähnlich vielfältige Signalfunktionen aus, wie die große Zahl der tierischen G-Proteine. Arbeiten aus unserer und anderen Arbeitsgruppen haben die Existenz funktioneller Komplexe zwischen der Untereinheit $G\alpha$ und wenigen Zielproteinen gezeigt. Die vorliegende Arbeit hat, vor allem mit Hilfe eines genetisch basierten Suchsystems, viele weitere, bisher unbekannte Bindepartner des $G\alpha$ -Proteins von *Eschscholzia californica* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert.
2. Das mating-based Split-Ubiquitin System (mbSUS) wurde mit Hilfe bekannter und wahrscheinlicher Interaktoren auf seine Anwendbarkeit zur Suche nach $G\alpha$ -bindenden Proteinen getestet und anschließend zum Durchsuchen von cDNA-Expressionsbanken (*Eschscholzia* und *Arabidopsis*) eingesetzt. Diese Methode beinhaltet die Fusion der Gene potentieller Interaktoren und von $G\alpha$ mit je einer Hälfte des Ubiquitins, die Expression und Interaktion der Fusionsproteine in Hefezellen und den Nachweis der Interaktion durch Expressionsanalyse von Testgenen. Die durchgeführten Experimente lieferten eine überraschend große Zahl potentieller Interaktoren.
3. Durch die kontrollierte Verringerung des verfügbaren $G\alpha$ -Proteins konnte die Stringenz des Testsystems erhöht und eine Rangfolge der Interaktorproteine nach ihrer Bindungsstärke zu $G\alpha$ erstellt werden. Unter den starken Bindepartnern befanden sich erwartungsgemäß das $G\beta$ -Protein, aber auch ein tetratricopeptide repeat (TPR)-enthaltendes Protein, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2 und Transkriptionsfaktoren der Zink-Finger und Leucin-Zipper Familien. Erstmals wurde eine Interaktion geringer Stärke zwischen zwei $G\alpha$ -Untereinheiten gefunden und damit die Existenz von $G\alpha$ -Dimeren gezeigt.
4. Auch wenn eine komplette Untersuchung aller Interaktionsklone nicht möglich war, zeigte sich ein hohes Maß an Spezies-Spezifität der $G\alpha$ -bindenden Proteine. Obwohl die $G\alpha$ -Proteine von *Eschscholzia* und *Arabidopsis* in ihrer Aminosäuresequenz zu 83 % übereinstimmen, wurden kaum identische oder homologe Bindepartner gefunden. In der gleichen cDNA-Expressionsbank (*Arabidopsis*) finden das $G\alpha$ -Protein von *Eschscholzia* und von *Arabidopsis* nur wenige übereinstimmende Interaktoren hoher Bindestärke: die

G β -Untereinheit, ein pentatricopeptide repeat (PPR)-enthaltendes Protein und eine 3-ketoacyl-CoA thiolase.

5. Die nachgewiesene feste Bindung von Transkriptionsfaktoren an das G α -Protein eröffnet eine neue Perspektive zur Wirkungsweise der pflanzlichen G-Proteine. Das G α in der Plasmamembran immobilisiert möglicherweise Transkriptionsfaktoren, welche bei einer Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren freigesetzt werden können. Damit würde die Plasmamembran zu einer von außen regulierbaren Schaltstelle für genregulatorische Proteine.
6. Ein Vergleich aller gefundenen Interaktionspartner zeigt, dass die am stärksten bindenden Proteine nicht die durch das G-Protein kontrollierten Zielproteine beinhalten, da diese sehr wahrscheinlich eine schwächere oder fluktuierende Interaktion zeigen. Die stark bindenden Interaktoren sind vermutlich für die Schaffung stabiler Komplexe verantwortlich, welche neben G α weitere Proteine enthalten und damit eine große Vielfalt an Bindemöglichkeiten für Zielproteine erzeugen.
7. Einige der mit dem mating-based Split-Ubiquitin System gefundenen Interaktoren stimmen mit dem Ergebnis biochemischer Suchverfahren überein. Hierzu zählen unter anderem das Enzym Phospholipase A₂ der Plasmamembran, welches sowohl in *Eschscholzia* als auch in *Arabidopsis* als G α -reguliert nachgewiesen und im Co-Immunkomplex mit G α isoliert wurde, sowie einige weitere Proteine aus diesem Immunkomplex. In den verwendeten cDNA-Expressionsbanken wurde zwar bisher kein Protein mit PLA₂-Aktivität eindeutig identifiziert, jedoch war für zwei von drei ausgewählten Proteinen mit PLA₂-Aktivität (patatin-ähnliche Enzyme) eine Interaktion mit G α eindeutig nachweisbar.

1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, einen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion im pflanzlichen System zu leisten. Heterotrimere G-Proteine spielen in Pflanzen eine ähnlich weitreichende Rolle wie im tierischen System, obwohl in jeder Pflanze höchstwahrscheinlich nur eine $G\alpha$ -, eine $G\beta$ -, beziehungsweise zwei $G\gamma$ -Untereinheiten existieren. Dies steht im Gegensatz zu der relativ großen Zahl der jeweiligen Untereinheiten und der damit verbundenen strukturellen Vielfalt der G-Proteine in tierischen Zellen.

Besonderes Interesse galt den Bindepartnern der Untereinheit $G\alpha$, welche wichtige Stationen der Signalweiterleitung darstellen. Vorausgegangene Untersuchungen in Zellen des kalifornischen Goldmohns (*Eschscholzia californica*) zeigten, dass die Aktivität des Enzyms Phospholipase A₂ (PLA₂) innerhalb eines stabilen Komplexes mit der $G\alpha$ -Untereinheit kontrolliert wird und damit einen Signalweg zur Expression der Alkaloidbiosynthese einschaltet (Roos *et al.*, 2006; Heinze *et al.*, 2007). Der Startpunkt dieser Arbeit war somit das auf Aktivitätsebene identifizierte Zielenzym Phospholipase A₂. Es stellte sich die Frage, ob eine Interaktion dieser beiden Proteine existiert und welche weiteren Zielproteine beziehungsweise Bindepartner von $G\alpha$ in verschiedenen Pflanzen identifiziert werden können. Denn bisher sind nur wenige direkte Interaktionen von $G\alpha$ mit Zielproteinen bekannt, wie zum Beispiel mit Phospholipase D (Zhao und Wang, 2004), Pirin (Lapik und Kaufman, 2003) und Prephenatdehydratase (Warpeha *et al.*, 2006).

Für die Identifikation von Interaktionspartnern wurden neben zellbiologischen und biochemischen Verfahren vor allem das genetisch basierte Split-Ubiquitin System benutzt und für die Aufgabenstellung optimiert. Zur Einführung in die Thematik soll ein kurzer Überblick über den bisherigen Erkenntnisstand der G-Protein-vermittelten pflanzlichen Signaltransduktion gegeben werden, gefolgt von der Vorstellung des verwendeten mating-based Split-Ubiquitin Systems.

1.1 G-Protein-vermittelte Signaltransduktion

1.1.1 Plasmamembran-Rezeptoren

Die Aufnahme (Perzeption) extrazellulärer Signale (zum Beispiel Phytohormone, Pathogene, Lichtimpulse) erfolgt in der Regel über membranständige Rezeptoren. Diese besitzen eine extrazelluläre und eine intrazelluläre Domäne, welche durch mindestens ein Transmembran-Segment miteinander verbunden sind. Signalmoleküle der Umwelt werden von der extrazellulären Domäne erkannt und gebunden. Anschließend wird die enthaltene Information durch Konformationsänderung des Rezeptors auf die intrazelluläre Domäne übertragen und von dort auf ein Zielprotein im Zellinneren geleitet.

Plasmamembran-Rezeptoren lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Signalübertragungsmechanismen in drei Klassen einteilen (Tabelle 1). Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren ändern nach Bindung eines Signals durch Konformationsänderung die

Tab. 1: Überblick wichtiger Plasmamembran-Rezeptoren

	Ionenkanal	Enzym-gekoppelt (Rezeptor-Tyrosinkinasen)	G-Protein-gekoppelt
Strukturmerkmal	mehrere Transmembrandomänen Bildung einer Kanalpore	1 Transmembrandomäne 1 extrazelluläre Domäne 1 cytosolische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität	7 Transmembrandomänen 3 extrazelluläre und 3 intrazelluläre Schleifen
externe Signale	<u>Liganden-gesteuert:</u> Acetylcholin, Nicotin <u>Spannungsgesteuert:</u> Änderung des Membranpotentials	Wachstumsfaktoren, Insulin	Hormone, Cytokine, Neurotransmitter, Licht, Geruchsstoffe
Mechanismus	Konformationsänderung Öffnen und Schließen der Pore	Dimerisierung und Aktivierung der Kinaseaktivität Autophosphorylierung best. Tyrosinreste der zytosolischen Rezeptordomänen	Konformationsänderung G-Protein-Bindung / Aktivierung über 3. intrazelluläre Schleife Dissoziation von G α und G $\beta\gamma$, Interaktion mit Effektor
Effektorproteine (Bsp.)		GTP-aktivierendes Protein (GAP), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI ₃ -Kinase), Phospholipase C γ , SH-Adapterproteine (GRB2, Sos) und Ras Aktivierung,	Adenylylcyclase, Phospholipase C β , Phosphodiesterase VI, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI ₃ -Kinase), Ionenkanäle
second messenger		IP ₃ , DAG	cAMP, cGMP, DAG, IP ₃ , Ca ²⁺ , Änderung des Membranpotentials

Leitfähigkeit des Kanals und kontrollieren damit Ionenströme (Ionenselektivität). Enzymgekoppelte Rezeptoren durchspannen die Zellmembran nur einmal, wobei die Signalbindungsstelle nach außen gerichtet ist und die katalytische Domäne ins Zellinnere ragt. Die Bindung eines Signals führt zur Phosphorylierung der zytosolischen Domäne beziehungsweise benachbarter Proteine. Am besten bekannt sind Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität und Serin/Threoninkinaseaktivität.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die größte und strukturell vielseitigste Gruppe innerhalb der Plasmamembran-Rezeptoren dar. Im Humangenom gibt es über 800 dieser Rezeptoren (Pierce *et al.*, 2002), während in Pflanzen bisher kein GPCR eindeutig identifiziert werden konnte. Allerdings wurden einige Dutzend Gene im Arabidopsisgenom gefunden, die für Proteine mit einer den tierischen GPCRs analogen Topologie von sieben Transmembrandomänen codieren (Chen, 2008). Zu diesen zählt der wahrscheinliche G-Protein-gekoppelte Rezeptor GCR1, für den eine Interaktion mit $G\alpha$ nachgewiesen werden konnte (Pandey und Assmann, 2004).

GPCRs stehen am Anfang von Signalkaskaden, welche die Aktivität von Proteinen, Enzymen oder Ionenkanälen über das zwischengeschaltete heterotrimere G-Protein regeln. Die Strukturen dieser Rezeptoren sind ähnlich und setzen sich aus dem extrazellulären N-Terminus, sieben hydrophoben α -Helices, welche in die Plasmamembran eingelagert und durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, sowie einem intrazellulären C-Terminus zusammen. Während die sieben Transmembran-Helices hochkonserviert sind und als Namensgeber (7TM-Rezeptoren) dienen, können die Längen von N- und C-Terminus, aber auch die der Schleifen stark variieren und legen die Individualität eines gegebenen Rezeptors fest. Durch die Erkennung und Bindung eines Signalmoleküls kommt es zur Konformationsänderung vor allem der dritten und sechsten Transmembrandomäne (Palczewski *et al.*, 2000; Vilardaga *et al.*, 2003), wobei das nachgeschaltete G-Protein insbesondere mit der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors interagiert. Die Reizweiterleitung, als Ergebnis der Aktivierung / Hemmung des Zielproteins, erfolgt dann mit Hilfe von koordinierten Protein-Protein-Interaktionen und einer Aktivierung zwischengeschalteter Effektoren. Eine besondere Bedeutung haben hierbei die sekundären Botenstoffe (second messenger), wie zum Beispiel Calciumionen (Ca^{2+}), zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3), 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Lysophosphatidylcholin (LPC). Diese Moleküle initiieren weiterführende, intrazelluläre Signalkaskaden, welche zur Amplifizierung des durch G-Proteine gewandelten Signals führen. Meist nutzen unterschiedliche Signalkaskaden dasselbe intermediäre

Signalmolekül, was die Entstehung von Schnittstellen und Netzwerken innerhalb der Signaltransduktion zur Folge hat. Diese Netzwerke können, unter anderem durch „crosstalk“ zwischen verschiedenen Signalwirkungen, nachgewiesen werden.

1.1.2 Heterotrimeres G-Protein

1.1.2.1 Basisinformationen tierischer G-Proteine

Guaninnukleotid-bindende und -hydrolysierende Regulatorproteine, oder kurz G-Proteine, sind evolutionär konservierte Module der Signaltransduktion und wurden in allen eukaryotischen Organismen gefunden. Sie besetzen die Brückenposition zwischen einem meist membranständigen Rezeptor und einem Effektorprotein. Eine Unterteilung erfolgt in membranständige heterotrimeren G-Proteine und zytosolische kleine G-Proteine.

Das heterotrimeren G-Protein der Säuger (siehe Abbildung 1) bildet einen Komplex aus den drei Untereinheiten G-alpha ($G\alpha$), G-beta ($G\beta$) und G-gamma ($G\gamma$), wobei die $G\alpha$ -Untereinheit eine GDP/GTP-Bindungsdomäne besitzt und meist mit dem Plasmamembran-Rezeptor assoziiert ist.

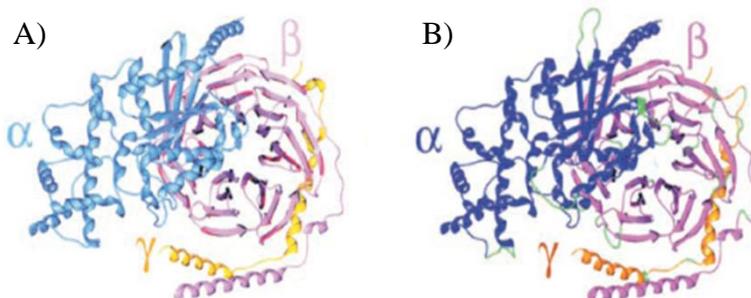


Abb. 1: Heterotrimeren G-Proteine (Ullah *et al.*, 2003)

- A) Konsensus-Modell tierischer Zellen (Rind, Ratte, Mensch).
 B) Abgeleitete Proteinstruktur des pflanzlichen Trimers.

Im tierischen System existiert eine hohe Diversität der Untereinheiten: das menschliche Genom weist zum Beispiel 17 Gene von $G\alpha$ (einschließlich Spleißvarianten führt dies zu 23 $G\alpha$ -Untereinheiten), fünf von $G\beta$ und zwölf von $G\gamma$ auf (Jones und Assmann, 2004). So können theoretisch 1.380 Kombinationen verschiedener Heterotrimeren gebildet werden. Trotz nachweislicher Expressionsunterschiede der einzelnen Untereinheiten in verschiedenen Zelltypen und in bestimmten Entwicklungsstadien ist bekannt, dass mehr als 100 dieser heterotrimeren Komplexe in einer tierischen Zelle existieren (Jones, 2002). Dies erklärt die Beteiligung der heterotrimeren G-Proteine an zahlreichen Signalwegen, wie bei der

Regulation von Ionenkanälen (Gilman, 1987; Simon *et al.*, 1991) und der Zelldifferenzierung (Watkins *et al.*, 1992). Aber auch der Riech- und Geschmackssinn, sowie der Sehvorgang werden über G-Proteine vermittelt (Alberts *et al.*, 1995, Seite 889-891; Lodish *et al.*, 2001, Seite 1027-1036):

G-Protein-gekoppelte olfaktorische Rezeptoren der Nasenschleimhaut erkennen und binden Geruchstoffe, aktivieren dadurch ein olfaktorisches G-Protein (G_{olf}), welches wiederum die Adenylylcyclase aktiviert. Der cAMP-Spiegel der Zelle steigt an und es kommt zur Öffnung von Kationenkanälen. Das daraufhin durch die Depolarisation der Zellmembran ausgelöste Aktionspotential wird über den *Bulbus olfactorius* ans Gehirn weitergeleitet.

Die Retina der Wirbeltiere enthält sogenannte Stäbchenzellen, die der Wahrnehmung von Grautönen bei schwachem Licht verschiedener Wellenlängen dienen. In deren äußeren Segmenten befinden sich jeweils etwa 1.000 abgeflachte Membranscheiben, in welchen Rhodopsin eingelagert ist. Dieses besteht aus dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor Opsin, der mit dem lichtabsorbierenden Pigment 11-*cis*-Retinal kovalent verknüpft ist. Letzteres absorbiert Licht einer Wellenlänge von etwa 400 bis 600 nm, wodurch dessen Geometrie verändert und Opsin aktiviert wird. Dieser Vorgang führt zur Aktivierung des signalübertragenden G-Proteins Transducin (G_t), welches dann die Aktivierung der cGMP-Phosphodiesterase bewirkt. Durch die daraus resultierende Senkung des cGMP-Gehaltes werden cGMP-gesteuerte Kationenkanäle geschlossen und es kommt zur Membranhypolarisation. Mittels eines trimeren G-Proteins wird so ein Lichtreiz in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Der aus dem tierischen System bekannte und allgemein anerkannte Mechanismus der durch G-Proteine vermittelten Signalübertragung ist in Abbildung 2 dargestellt. Diese wird durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden (Signal) an einen Transmembranrezeptor, welcher meist zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört, ausgelöst. Die inaktive Konformation von $G\alpha$ hat GDP gebunden und ist mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer assoziiert. Der durch eine Ligandenbindung in seiner Konformation veränderte Rezeptor bindet das heterotrimere G-Protein. Die Interaktion von GPCR und $G\alpha$ führt zur Konformationsänderung der α -Untereinheit und damit zum Austausch von GDP durch GTP und zur Dissoziation vom $\beta\gamma$ -Komplex. Die Untereinheiten $\beta\gamma$ zerfallen nicht weiter, sondern stellen eine funktionelle Einheit dar. Die nun freigesetzten $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Proteine können mit unterschiedlichen Effektoren interagieren und verschiedenste Signaltransduktionswege in der Zelle einleiten. Beispiele für Effektoren sind Adenylylcyclasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) und Phospholipasen. Durch die dem $G\alpha$ eigene GTPase-Aktivität und unterstützt

durch GAP-Proteine (GTPase aktivierende Proteine aus der Superfamilie der RGS-Proteine (regulators of G-protein signaling)) wird anschließend GTP hydrolysiert und das G-Protein geht wieder in seinen inaktiven, GDP und G $\beta\gamma$ -bindenden Zustand über. In diesem Zustand ist die Affinität von G α zu seinen Effektorproteinen 100fach geringer als im aktiven Zustand (Hamm *et al.*, 1998). Das heterotrimere G-Protein kann nach erneuter Interaktion mit GPCR wieder aktiviert werden.

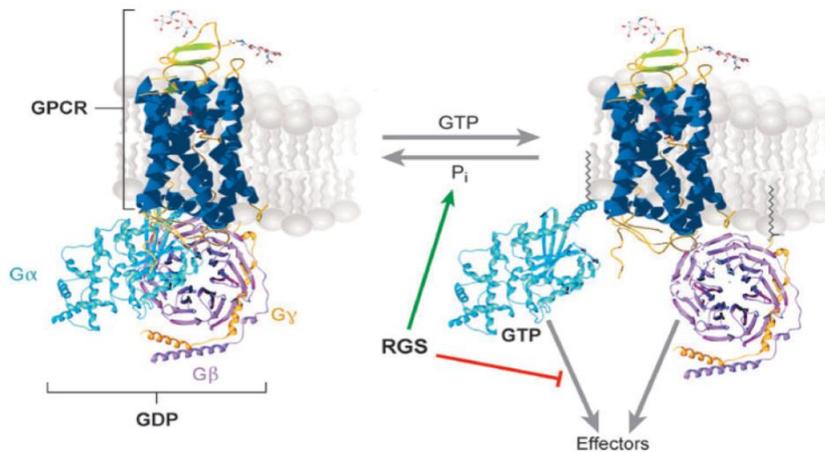


Abb. 2: Schematische Darstellung des G-Protein Signalzyklus (Temple und Jones, 2007)

Klassisches Model des G-Protein Signalzyklus. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) werden durch die Struktur des Rhodopsins dargestellt. Die Abkürzung RGS steht für „regulators of G-protein signaling“.

1.1.2.2 Struktur pflanzlicher G-Proteine

Pflanzliche heterotrimere G-Proteine erfüllen ebenfalls eine Vielzahl distinkter Signalfunktionen, unterscheiden sich aber in der Anzahl der jeweiligen Untereinheiten und damit in ihrer strukturellen Variabilität deutlich von denen tierischer Organismen. In den bisher untersuchten Pflanzen wurde jeweils nur eine G α - und G β -Untereinheit identifiziert. *Arabidopsis thaliana* besitzt neben einem G α (GPA) und einem G β (AGB) noch zwei G γ -Untereinheiten AGG1 und AGG2. Es können also maximal zwei unterschiedliche Heterotrimere gebildet werden, die offenbar mehrere verschiedene Effektoren kontrollieren. G α -Proteine sind inzwischen aus einer größeren Zahl von Pflanzen bekannt und identifiziert: unter anderem von *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 1990), *Lotus* (Poulsen *et al.*, 1994), *Oryza* (Ishikawa *et al.*, 1995), *Solanum* (Provart *et al.*, 1995), *Lupinus* (Kutsnetsov und Oelmueller, 1996), *Pisum* (Marsh und Kaufman, 1999), *Nicotiana* (Ando *et al.*, 2000), *Eschscholzia* (Heinze *et al.*, 2007), *Phaseolus* (Touhara und Hosokawa, 2005) und *Ricinus* (Chan *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser zehn Proteine ist im Anhang enthalten (Anhang I). Sie haben ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa und weisen

eine hohe Identität untereinander auf, zeigen jedoch nur eine moderate Ähnlichkeit zu den tierischen G α -Proteinen (circa 30 % Identität für das *Arabidopsis*-G α). Durch Myristylierung und Palmitylierung wird das pflanzliche G α posttranslational modifiziert, was seine Membranassoziation bewirkt. Der C-Terminus interagiert sowohl mit dem GPCR als auch dem Effektorprotein, während das N-terminale Ende mit dem G $\beta\gamma$ -Dimer interagiert (Tuteja und Sopory, 2008). Die Aminosäuresequenzen pflanzlicher G α -Proteine besitzen strukturelle Ähnlichkeiten in bestimmten Domänen, wie dem P-Loop für die Nukleosidtriphosphat-Bindung, dem DxxGQ-Motiv für die Hydrolyse von Guanintriphosphat sowie dem NKxD Motiv für die Guanin-Erkennung (Temple und Jones, 2007) (siehe Anhang I).

Die pflanzliche G β -Untereinheit (35 bis 40 kDa) gehört zur Familie der WD40-repeat Proteine. Diese sich wiederholende Sequenz umfasst 36 – 46 Aminosäuren, endet gewöhnlich mit Trp-Asp (WD) und ist in allen Eukaryoten zu finden (Neer *et al.*, 1994).

Stärkere strukturelle Differenzen weisen die pflanzlichen G γ -Untereinheiten (6 bis 11 kDa) auf. Ihre wichtigste Gemeinsamkeit ist die Ausbildung eines Lipidankers am C-Terminus, über welchen das G $\beta\gamma$ -Dimer mit der Plasmamembran assoziiert ist. Für die Stabilität des Dimers sorgt die Ausbildung einer coiled coil-Struktur zwischen G β und G γ (Garritsen *et al.*, 1993).

1.1.2.3 Biologische Funktion pflanzlicher G-Proteine

Tabelle 2 bietet einen repräsentativen Ausschnitt aus der Fülle von Daten, welche die Beteiligung pflanzlicher G-Proteine an Wachstum, Entwicklung und umweltabhängigen Regulationsprozessen belegen.

Tab. 2: Funktionen heterotrimerer G-Proteine in Pflanzen (Übersicht)

G-Protein- / GPCR-vermittelte Funktion	Pflanze	Referenz
<u>Wildtyp</u>		
Behandlung mit Pilz-Elicitor → Generierung reaktiver Sauerstoffspezies	<i>Lycopersicon</i>	Vera-Estrella <i>et al.</i> , 1994
Induktion einer Pathogen-ausgelösten Genexpression durch die Cholera-toxin A1 Untereinheit	<i>Nicotiana</i>	Beffa <i>et al.</i> , 1995
Behandlung mit Pseudomonaden → Generierung reaktiver Sauerstoffspezies	<i>Glycine</i>	Rajasekhar <i>et al.</i> , 1999
Behandlung mit Hefe-Elicitor → Aktivierung der Phospholipase A ₂ -Aktivität, Anstieg der Alkaloidbiosynthese	<i>Eschscholzia</i>	Roos <i>et al.</i> , 1999; Heinze <i>et al.</i> , 2007
direkte Interaktion von Phospholipase D α 1 und GPA1	<i>Arabidopsis</i>	Zhao und Wang, 2004
Blaulicht-vermittelte Phenylalaninsynthese	<i>Arabidopsis</i>	Warpeha <i>et al.</i> , 2006

G-Protein- / GPCR-vermittelte Funktion	Pflanze	Referenz
<u>Gα-Nullmutante</u>		
verminderte Zellteilungsrate	<i>Arabidopsis</i>	Ullah <i>et al.</i> , 2001
Abscisinsäure (ABA) gesteuerte Regulation von Ionenkanälen	<i>Arabidopsis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2001
100× weniger Gibberellin-empfindlich	<i>Arabidopsis</i>	Ullah <i>et al.</i> , 2002
empfindlicher gegenüber Mehltau	<i>Oryza</i>	Suharsono <i>et al.</i> , 2002
veränderte Auxin-vermittelte Zellteilung: Auxin-unempfindlicher	<i>Arabidopsis</i>	Ullah <i>et al.</i> , 2003
Unempfindlichkeit gegenüber extrazellulärer Calmodulin-stimulation zur Schließung der Spaltöffnungen	<i>Arabidopsis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2004
verminderte Sensitivität gegenüber BR (Brassinosteroiden)	<i>Oryza</i>	Wang <i>et al.</i> , 2006
GPA1- und BR-vermittelte Signalwege wirken zusammen, um die Zellteilung zu regulieren	<i>Arabidopsis</i>	Gao <i>et al.</i> , 2008
GPA1 ist Negativregulator der Transpirationseffizienz	<i>Arabidopsis</i>	Nilson und Assmann, 2010
<u>Antisense Gα</u>		
Zwergwuchs: kurze Internodien, kompakte Rispen, kleine Samen	<i>Oryza</i>	Fujisawa <i>et al.</i> , 1999
Behandlung mit Hefe-Elicitor → stark verminderte PLA ₂ -Aktivität und Alkaloidbiosynthese	<i>Eschscholzia</i>	Viehweger <i>et al.</i> , 2006
<u>Gα Überexpression</u>		
Überempfindlichkeit gegenüber Rot- und Dunkelrotlicht	<i>Arabidopsis</i>	Okamoto <i>et al.</i> , 2001
1×10 ⁶ Gibberellin-empfindlicher	<i>Arabidopsis</i>	Ullah <i>et al.</i> , 2002
<u>Gβ-Nullmutante</u>		
veränderte Morphologie: längere Blattstiele, kleinere Schoten und Blüten	<i>Arabidopsis</i>	Lease <i>et al.</i> , 2001
veränderte Auxin-vermittelte Zellteilung: Auxin-empfindlicher	<i>Arabidopsis</i>	Ullah <i>et al.</i> , 2003
Beteiligung an der Signalweiterleitung, die zum UPR (unfolded protein response)-vermittelten Zelltod führt	<i>Arabidopsis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<u>Gα- / Gβ-Nullmutante</u>		
Regulatoren der Hypersensitiven Reaktion	<i>Arabidopsis</i>	Joo <i>et al.</i> , 2005
erhöhte Zellteilungsrate im Wurzelmeristem	<i>Arabidopsis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2006
beeinträchtigte Hemmung des inneren K ⁺ (K _{in})-Stroms und der Schließzellenöffnung durch ABA	<i>Arabidopsis</i>	Fan <i>et al.</i> , 2008
Regulatoren der Hindernisvermeidung der Wurzeln durch berührungs-induzierte Freisetzung von ATP	<i>Arabidopsis</i>	Weerasinghe <i>et al.</i> , 2009
<u>GCR1- / Gα-Nullmutante</u>		
GCR1 fungiert als Negativregulator der GPA1-vermittelten ABA-Antwort in Schließzellen	<i>Arabidopsis</i>	Pandey und Assmann, 2004
<u>GCR1 / Gα Überexpression</u>		
Regulation der DNA-Synthese durch Aktivierung von Phospholipase C	<i>Nicotiana</i>	Apone <i>et al.</i> , 2003

Wachstums- und Entwicklungsprozesse

Mehrere Studien zeigen die Beteiligung von G-Proteinen an der Regulation der Sensitivität von Pflanzen und Geweben gegenüber Phytohormonen wie Gibberelinsäure (Ullah *et al.*, 2002), Abscisinsäure (Pandey und Assmann, 2004) und Auxin (Ullah *et al.*, 2003). G-Proteine sind dabei wahrscheinlich nicht direkt in die vom Hormon ausgelöste Signalkaskade einbezogen, sondern hemmen oder beschleunigen deren Ablauf. Damit sind sie indirekt an der Steuerung von Zellwachstum, Zellteilung und Samenreifung beteiligt. Interessanterweise zeigen Mutanten mit fehlenden Untereinheiten oft nicht denselben Phänotyp wie nach Verlust einer anderen Untereinheit des Heterotrimers. So konnte in *Arabidopsis thaliana* die G β -Untereinheit als ein Negativregulator für Auxin-vermittelte Wachstumsprozesse identifiziert werden, denn Mutanten ohne funktionsfähiges G β -Protein zeigten eine Hypersensitivität gegenüber Auxin. G α -Nullmutanten sind dagegen Auxin-unempfindlicher (Ullah *et al.*, 2003). Auch das Zusammenspiel mit einem Rezeptor wurde untersucht: Apone *et al.* (2003) zeigten eine Kontrolle der DNA-Synthese (erhöhte Thymidin-Einbindung in die DNA) im Rahmen des Zellzyklus, welche den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GCR1) und seine Interaktion mit der G α -Untereinheit (GPA1) erfordert. Dies wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Aktivierung einer Phospholipase C (als Effektor von GCR1) und Inosit-1,4,5-trisphosphat (als second messenger) vermittelt.

Pathogenabwehr

Seit langem ist bekannt, dass die Pathogen-ausgelöste Generierung reaktiver Sauerstoffspezies über G-Proteine kontrolliert wird, zum Beispiel nach der Behandlung suspensionskultivierter *Lycopersicon esculentum*-Zellen mit Pilz-Elicitor (Vera-Estrella *et al.*, 1994) oder nach der Behandlung von *Glycine max*-Zellen mit Pseudomonaden (Rajasekhar *et al.*, 1999). Viehweger *et al.* (2006) zeigten eine durch das G-Protein kontrollierte PLA₂, welche in suspensionskultivierten *Eschscholzia californica*-Zellen nach Kontakt mit Hefe-Elicitor erhöhte Enzymaktivität zeigt und transient LPC akkumuliert (siehe Abschnitt 1.1.3). Desweiteren kontrollieren die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins offenbar selektiv den „oxidative burst“, die initiale Stufe der Hypersensitiven Reaktion. Joo *et al.* (2005) haben *Arabidopsis thaliana*-Mutanten untersucht und festgestellt, dass das erste von zwei Maxima des „oxidativen bursts“ durch das gesamte Heterotrimer oder durch den $\beta\gamma$ -Komplex gesteuert wird. Das zweite Maximum dagegen erfordert ausschließlich die Aktivität der G α -Untereinheit. In *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde die Beteiligung von G α an der Ca²⁺ / Calmodulin-vermittelten Signalweiterleitung gezeigt (Chen *et al.*, 2004). Extrazelluläres Calmodulin aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, die über einen Anstieg

von Calciumionen und Wasserstoffperoxid im Zytosol zur Schließung der Spaltöffnungen führt.

Die in Pflanzen derzeit bekannten Effektorproteine (Targets) des heterotrimeren G-Proteins sind im Wesentlichen Ionenkanäle für Kalium und Calcium, Prephenatdehydratase, Pirin, sowie die Phospholipasen A₂, C und D. In Anbetracht der weitreichenden Funktionen des heterotrimeren G-Proteins und deren Bedeutung für die Pflanze in seiner Gesamtheit, sind wesentlich mehr Effektorproteine zu erwarten. Ihre Kenntnis ist unter anderem notwendig,

- um gemeinsame Prinzipien der Wirkungsweise pflanzlicher G-Proteine zu erkennen, zum Beispiel die Existenz und Zusammensetzung von G-Protein-Target Komplexen,
- um mögliche Unterschiede der Struktur und Wirkungsweise der G-Proteine verschiedener Pflanzenspezies aufzudecken,
- um die Rolle von G-Proteinen bei der Kontrolle der Sekundärstoffbiosynthese, das heißt eines hoch spezialisierten Stoffwechselgebietes, besser zu verstehen.

1.1.3 Phospholipase A₂ – ein Target von G α

In Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica* wurden im Laufe der letzten Jahre klare Belege für die Existenz einer durch ein G-Protein kontrollierten Phospholipase A₂ ermittelt (siehe Tabelle 2; Heinze *et al.*, 2007; Viehweger *et al.*, 2006; Roos *et al.*, 2006; Roos *et al.*, 1999).

Phospholipasen vom Typ A spalten eine Esterbindung in verschiedenen 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-Phosphoglyceriden hydrolytisch, wodurch ein Lysophospholipid (LP) und eine freie Fettsäure entstehen (siehe Abbildung 3). Das in *Eschscholzia* funktionell charakterisierte Enzym hat eine Spezifität für die *sn*-2 Position (Viehweger *et al.*, 2002), welche auch in anderen pflanzlichen PLAs festgestellt wurde (Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999).

Phospholipase A₂ ist ein wichtiges Protein der Signaltransduktion. Im tierischen System setzt sie zum Beispiel Arachidonsäure, den Ausgangsstoff der Prostaglandinsynthese, aus Phospholipiden frei. Prostaglandine sind häufig Mediatoren von Entzündungsprozessen und steuern unter anderem die Blutgerinnung. Derzeit wird die PLA₂-Superfamilie in fünf Typen eingeteilt, in sekretierte (sPLA₂), zytosolische (cPLA₂), Ca²⁺-unabhängige (iPLA₂) und lysosomale PLA₂s, sowie in platelet-activating factor Acetylhydrolasen (PAF-AH) (Schaloske und Dennis, 2006).

Über die pflanzlichen PLA₂s ist noch sehr wenig bekannt, aber nach bisherigen Erkenntnissen wird angenommen, dass sie sich in zwei Hauptgruppen aufteilen: sekretierte PLA₂s (sPLA₂s) und patatin-ähnliche Enzyme (Mansfeld, 2009; Scherer, 2010). Nach abgeschlossener

Genomsequenzierung von *Arabidopsis* konnte kein Hinweis auf eine zytosolische PLA₂, die im tierischen System die wichtigste Rolle bei der Signaltransduktion spielt, gefunden werden (Mansfeld, 2009). Sekretierte PLA₂s haben ein kleines Molekulargewicht (13 – 18 kDa), eine hohe Anzahl von Disulfidbrücken (bis zu acht) und benötigen Calciumionen für ihre Aktivität. In *Arabidopsis* konnten vier verschiedene sPLA₂s identifiziert werden (Lee *et al.*, 2005). Die patatin-ähnlichen Enzyme sind dagegen etwas größer (48 bis 50 kDa) und zeigen eine weitgehende Homologie zu Patatin, einem Speicherprotein pflanzlicher Vakuolen. Desweiteren sind sie unspezifischer, denn neben PLA₂- besitzen sie auch PLA₁-Aktivität. Zehn Gene dieses Enzymtyps wurden in *Arabidopsis* identifiziert (Holk *et al.*, 2002) und biochemische Studien sowie Sequenzvergleiche zeigten eine gewisse Ähnlichkeit mit tierischen zytosolischen PLA₂s (Balsinde und Balboa, 2005).

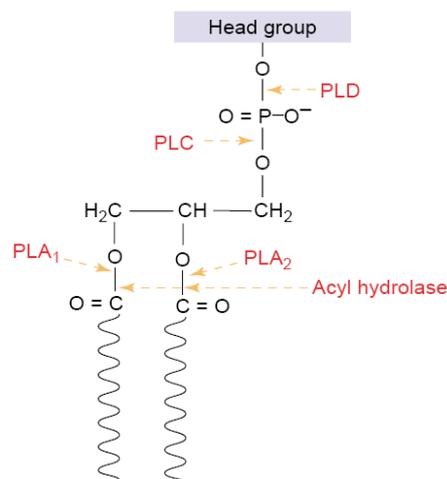


Abb. 3: Phospholipidstruktur und dessen Spaltstellen von PLD, PLC, PLA₁, PLA₂ und Acylhydrolasen (Wang, 2004)

Dargestellt sind die Hydrolyse-Angriffspunkte der Phospholipasen.
head group = Kopfgruppe bestehend aus einer Alkohol-Komponente,  = Fettsäurerest

Für eine Beteiligung pflanzlicher PLA₂s an Entwicklungs- und Regulationsprozessen spreche folgende Erkenntnisse: Paul *et al.* (1998) zeigten eine Mitwirkung bei der Auxin-ausgelösten Signaltransduktion in Zellen von *Petroselinum crispum* und *Glycine max*. Desweiteren weisen Daten von Heinze *et al.* (2007) und Dhondt *et al.* (2002) auf eine Funktion bei der Pathogenabwehr hin. Im Jahr 2003 bewiesen Lee *et al.* die regulatorische Funktion einer sekretorischen Phospholipase A₂ beim Zellwachstum und des Spross-Gravitropismus in *Arabidopsis thaliana*.

Die beiden Spaltprodukte der Phospholipase A₂, Lysophospholipid (LP) und freie Fettsäure, stellen in zahlreichen Pflanzenspezies Botenmoleküle dar. Fettsäuren dienen vor allem Lipoxygenasen als Substrat und Linolensäure ist Ausgangspunkt der Biosynthese von

Jasmonsäure, welche, neben ihrem Vorläufermolekül 12-Oxophytodiensäure und ihren Derivaten, ein multifunktionelles Signalmolekül darstellt und unter anderem die Expression von Abwehrgenen stimuliert (Wasternack, 2007; Memelink, 2009). Suspensionszellkulturen von *Eschscholzia californica* zeigten eine Akkumulation von Linolen- und Jasmonsäure nach Elicitorbehandlung (Blechert *et al.*, 1995). Lysophospholipide, zum Beispiel Lysophosphatidylcholin (LPC), aktivieren die H⁺-ATPase der Plasmamembran, was 1989 durch Palmgren und Sommarin in *Avena sativa* dargestellt wurde. Die bisher am besten charakterisierte Signalfunktion von LPC in Pflanzen ist die Aktivierung von H⁺/Na⁺-Antiportern am Tonoplast suspensionskultivierter *Eschscholzia californica*-Zellen (Viehweger *et al.* 2002). LPC entsteht hier durch eine Phospholipase A₂ der Plasmamembran, welche nach Kontakt mit Hefe-Elicitor über ein G-Protein aktiviert wird (Heinze *et al.*, 2007) (siehe Abschnitt 1.1.2.3). Nach Diffusion zur Vakuole bewirkt LPC eine Änderung der Na⁺-Sensitivität der H⁺/Na⁺-Antiporter. Diese ubiquitären Transportsysteme dienen in Halophyten und unter Salzstress der vakuolären Akkumulation von Na⁺ und damit dem Schutz vor toxischen Konzentrationen dieses Ions im Zytosol. In Gegenwart von LPC können die Antiporter bereits bei physiologischen Na⁺-Konzentrationen einen Efflux von H⁺ aus der Vakuole erzeugen (Viehweger *et al.*, 2002), was zur transienten Ansäuerung des Zytosols führt. Diese intrazelluläre pH-Änderung wirkt ihrerseits als Signal und induziert die Biosynthese der Benzophenanthridinalkaloide (Viehweger *et al.*, 2006), welche als Phytoalexine fungieren und das Wachstum von Bakterien und Pilzen verhindern, da sie in doppelsträngige DNA interkalieren und mit verschiedenen SH-Proteinen interagieren. Durch Ausscheidung dieser Alkaloide hat die Pflanze die Möglichkeit das Eindringen von Pathogenen, sowie deren Vermehrung und Ausbreitung im Wurzelraum zu verhindern.

Für die in *Eschscholzia* entdeckte plasmamembrangebundene Phospholipase A₂ ist bisher noch keine Sequenz bekannt und aktuelle Experimente zur Isolation des Enzyms werden durch die sehr geringen Proteinkonzentrationen erschwert. Auf funktioneller Ebene konnte nachgewiesen werden, dass die PLA₂ unabhängig von Ca²⁺ arbeitet und keine A₁-Aktivität besitzt (Viehweger *et al.*, 2002), was auf eine Ca²⁺-unabhängige Phospholipase A₂ schließen lässt. Desweiteren wurde gezeigt, dass das Enzym in der Plasmamembran unter der Kontrolle des G α -Proteins steht (Heinze *et al.*, 2007). Die nachfolgenden Belege stammen aus Suspensionskulturen von *Eschscholzia californica*:

1. Die Verringerung des Gehaltes an G α durch antisense G α -Transformation führt zu Zelllinien, welche gegenüber dem Wildtyp die Elicitor-Aktivierung der Phospholipase A₂ durch niedrige Elicitorkonzentrationen verloren haben. Das gleiche Ergebnis zeigen

Zellstämme, welche einen gegen $G\alpha$ gerichteten Antikörper vom scFv-Typ exprimieren (Viehweger *et al.*, 2006).

2. Die Inkubation von solubilisierten Plasmamembranproteinen mit einem Antikörper, welcher gegen das gesamte rekombinante $G\alpha$ -Protein gerichtet ist, führt zur Co-Präzipitation von $G\alpha$ und aktiver Phospholipase A_2 . Ein nur gegen den C-Terminus von $G\alpha$ (vermutlicher Ort der Effektorbindestellen) gerichteter Antikörper führt zur Präzipitation von $G\alpha$, jedoch nicht von PLA_2 (Heinze *et al.*, 2007).

3. Das Co-Immunpräzipitat von $G\alpha$ und PLA_2 zeigt eine Stimulation der PLA_2 -Aktivität nach Zusatz von $GTP\gamma S$ (Heinze *et al.*, 2007).

4. Nach einer nicht-denaturierenden PAGE von solubilisierter Plasmamembran konnten Proteinkomplexe nachgewiesen werden, die $G\alpha$ und PLA_2 -Aktivität enthalten. Bei pH 9,5 dissoziiert dieser Komplex und die PLA_2 -Aktivität ist nicht länger mit $GTP\gamma S$ stimulierbar, was für die Existenz eines detergens-resistenten Komplexes mit PLA_2 spricht. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Daten, welche an der Plasmamembran von Reis sehr große Proteinkomplexe (~ 400 kDa) zeigten, die $G\alpha$ zusammen mit $G\beta$ -, $G\gamma$ -Untereinheiten sowie weiteren, nicht identifizierten, Proteinen enthalten (Kato *et al.*, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem geprüft, ob eine durch $G\alpha$ kontrollierte PLA_2 auch in der Plasmamembran anderer Pflanzen, etwa *Arabidopsis*, nachweisbar ist. Damit sollte eine erste Frage nach der Verbreitung des in *Eschscholzia* gefundenen Regulationsmechanismus gestellt werden. Zugleich diene die oben genannte PLA_2 als Testfall für eine funktionelle Interaktion von $G\alpha$ und einem Effektorprotein in der Plasmamembran.

1.2 Ein genetisches Testsystem für Protein-Protein-Interaktionen: das mating-based Split-Ubiquitin System (mbSUS)

Etablierte Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Bei Protein-Protein-Interaktionen handelt es sich um nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der beteiligten Proteine. Die Funktionen dieser Wechselwirkungen im Signaltransfer, bei Wachstums- und Zellteilungsprozessen sowie beim Aufbau von Zellstrukturen sind ebenso mannigfaltig wie die Strukturen und die Dynamik der resultierenden Komplexe. Die Stärke dieser Komplexe reicht von stabilen, detergens-resistenten Assoziationen bis zu rasch fluktuierenden Interaktionen. So gibt es Proteinkomplexe, die stabil assoziiert sind, da der Verbund essentiell für ihre Funktion ist, andere dagegen werden ständig ab- und aufgebaut. Für eine Klassifikation werden die beteiligten Proteindomänen

herangezogen. Diese Domänen stellen strukturelle und funktionelle Einheiten auf der Proteinoberfläche dar, an denen meist sehr spezifische Interaktionen stattfinden und denen auch bestimmte Interaktionseigenschaften zugeordnet werden können. Die Wechselwirkung löst bei mindestens einem Partner Konformationsänderungen aus, wodurch neue Strukturen oder weiterführende Signale entstehen, welche meist eine Aktivierung, Inaktivierung oder Bindung von Effektoren zur Folge haben. Um die biologische Rolle eines spezifischen Proteins aufklären zu können, ist die Kenntnis seiner interagierenden Partner unverzichtbar.

Zur Identifizierung und Aufklärung von Protein–Protein–Interaktionen wurde bisher eine Vielzahl von Techniken eingesetzt. Zu den bekanntesten biochemischen Verfahren zählen Co–Immunpräzipitation und Bindungsstudien an immobilisierten Proteinen. Die Co–Immunpräzipitation verwendet mit Protein A oder G beschichtete Beads (Sephrose oder magnetische Mikropartikel), welche mit einem Antikörper beladen werden, um das entsprechende Antigen und dessen Interaktionspartner aus einem Proteingemisch zu präzipitieren. Die zweite Methode beruht auf der Immobilisierung des zu untersuchenden Proteins an einer Matrix. Dazu wird das entsprechende Protein mit einem Tag, zum Beispiel dem Polyhistidin–Tag zur Bindung an Nickelsepharose, überexprimiert. Eine solche Markierung kann Funktionsänderungen des Proteins zur Folge haben, weshalb eine markierungsfreie Detektion von Bindungsereignissen geeigneter ist. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR, Surface Plasmon Resonance), einer sehr sensitiven Methode, werden zu untersuchende Proteine stabil auf einer Chipoberfläche (Gold) immobilisiert und mit den entsprechenden Interaktionspartnern versetzt. Die Detektion einer Massenveränderung, also einer Proteininteraktion zweier oder mehrerer Partner, erfolgt durch die Verschiebung des Resonanzwinkels.

Desweiteren gibt es genetisch basierte Verfahren, welche meist auf dem Prinzip der Komplementierung von rekombinant produzierten Proteinbruchstücken, wobei fluoreszierende oder Gen–aktivierende Hybrid–Proteine entstehen, beruhen. Dazu zählen FRET (fluorescence resonance energy transfer)–basierte Verfahren und das Yeast–2–Hybrid System. Bei letzterem werden die Testproteine an die Interaktionsdomäne und die potentiellen Interaktionspartner an die DNA–Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors gekoppelt. Bei Bindung der Proteine entsteht ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor (Hybrid), dessen Bildung anhand der Aktivierung geeigneter Reportergene nachgewiesen wird. Da dies im Zellkern erfolgen muss, kommen nur lösliche, das heißt bewegliche Proteine als Interaktionspartner in Frage. Zudem muss die Interaktion außerhalb ihrer eigentlichen zellulären Umgebung erhalten bleiben.

Mating–based Split–Ubiquitin System (mbSUS)

Als Weiterentwicklung des Yeast–2–Hybrid Systems, besonders für Membranproteine, wurde 1994 von Johnsson und Varshavsky das Split–Ubiquitin System entwickelt. Es nutzt den Ubiquitin–abhängigen Proteinabbauweg als Reportermechanismus. Dessen Grundprinzip basiert darauf, dass das in eukaryotischen Zellen hochkonservierte Protein Ubiquitin (76 AS), welches als Marker für abzubauen Proteine dient, von diesen durch spezifische Proteasen abgespalten wird. Diese Proteasen haben eine hohe Spezifität für Ubiquitin und schneiden es vor der letzten Aminosäure. Sie erkennen auch ein Ubiquitin–Hybridprotein, das sich nach getrennter Expression der N–terminalen (Nub, 35 AS) und C–terminalen Hälfte (Cub, 41 AS) spontan bildet. Das Protein und seine beiden Hälften sind in Abbildung 4 dargestellt.

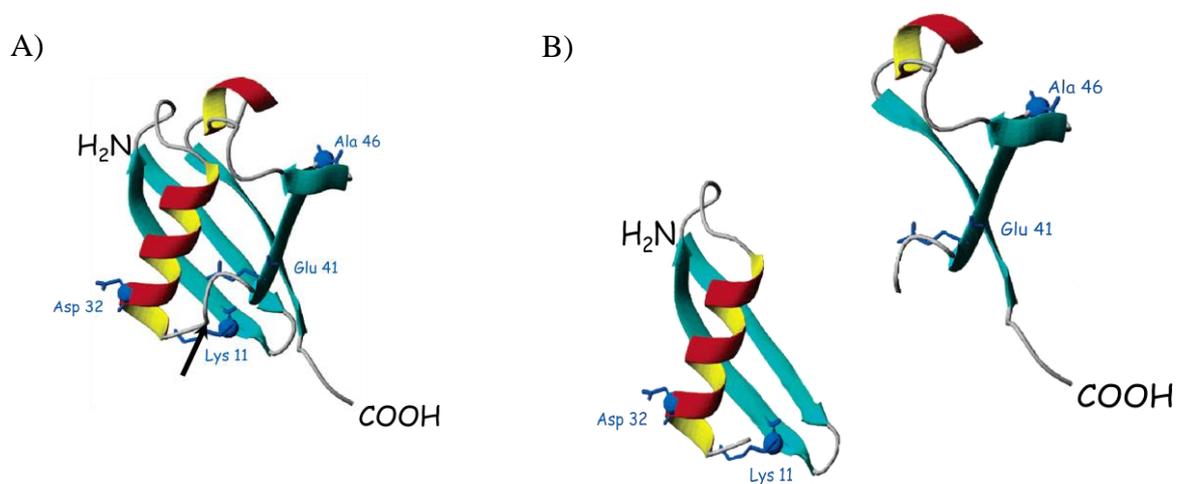


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ubiquitins (Zech *et al.*, 2005)

A) das hochkonservierte Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren (der schwarze Pfeil markiert die Spaltstelle)

B) links: N–terminale Hälfte mit 35 Aminosäuren; rechts: C–terminale Hälfte mit 41 Aminosäuren

Es erfolgt auch dann noch eine Erkennung durch die Ubiquitin–spezifischen Proteasen, wenn an die C–terminale Hälfte ein Reportermolekül, in diesem Fall der synthetische Transkriptionsfaktor PLV (Protein A–lexA–VP16), angehängt wurde. Nach der Zusammenlagerung beider Ubiquitin–Hälften wird der Transkriptionsfaktor PLV zusammen mit der letzten Aminosäure des Ubiquitins abgespalten und kann über die Aktivierung seiner Zielgene nachgewiesen werden. Bei Nutzung des Systems zum Interaktionsnachweis angekoppelter Proteine muss die spontane Assemblierung der Ubiquitin–Hälften verhindert werden. Dies gelang durch einen Austausch der Aminosäure Isoleucin mit Glycin (Position 13), was die Affinität der N–terminalen Hälfte (NubG) zur C–terminalen Hälfte stark reduzierte. Eine Zusammenlagerung kann nur dann eintreten, wenn beide Hälften durch die Interaktion der zu untersuchenden Proteine in räumliche Nähe gebracht werden. Dazu werden die Testproteine mit der N– beziehungsweise der C–terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert. Durch die

oben genannten Ubiquitin-spezifischen Proteasen wird der Transkriptionsfaktor an der Cub-Hälfte freigesetzt und die Interaktion nachweisbar (Johnsson und Varshavsky 1994; Stagljar *et al.*, 1998).

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Version des mating-based Split-Ubiquitin Systems (mbSUS) wurde 2004 von Obrdlik *et al.* beschrieben und verwendet Hefestämme verschiedenen Paarungstyps. Der Stamm THY.AP4 (Matingtyp a) enthält den Cub-Vektor (pMetYCgate) und die Reportergene *lacZ*, *his3* und *ade2*, welche nur bei Aktivierung des *lexA*-Promotors durch den abgespaltenen Transkriptionsfaktor PLV exprimiert werden. Der Hefestamm THY.AP5 (Matingtyp α) beinhaltet den Nub-Vektor. Es existieren mehrere Gateway-kompatible (Hartley *et al.*, 2000) Vektoren, darunter auch ein Destinationvektor zum Durchsuchen einer cDNA-Bank. Die Klonierung der entsprechenden cDNAs der Testproteine erfolgt mittels Co-Transformation und homologer Rekombination. Ein schematischer Überblick dieser *in vivo* Klonierung ist in Abbildung 5 dargestellt.

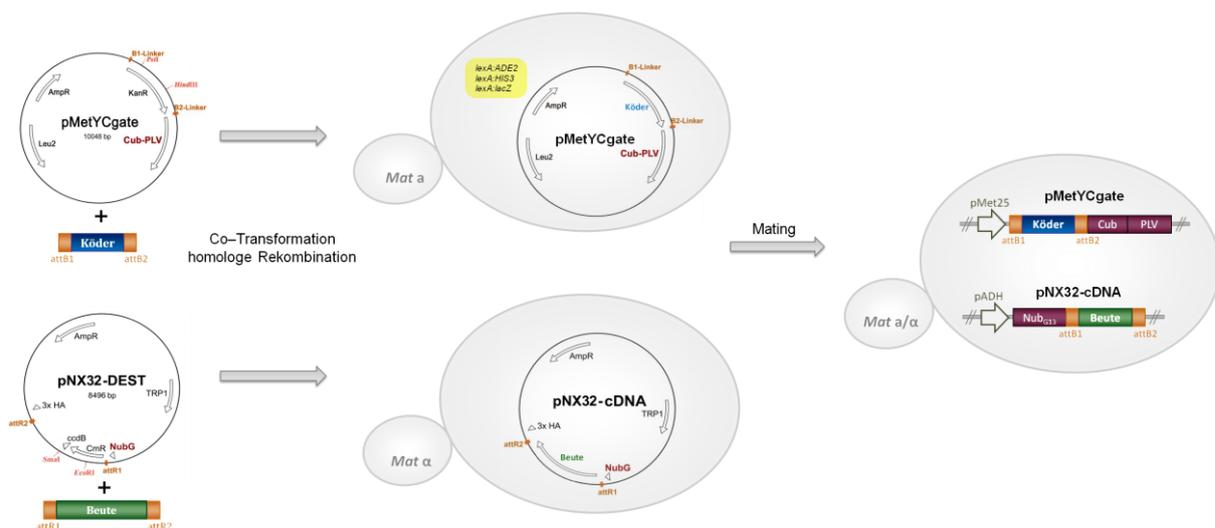


Abb. 5: Schematische Darstellung der *in vivo* Klonierung mit anschließendem Mating

Konstruktion der CubPLV- und Nub-Fusionsproteine durch homologe Rekombination von cDNAs der Testproteine (plus att sites, orange dargestellt) und entsprechendem Vektor (für CubPLV-Fusionen: pMetYCgate; für Nub-Fusionen: pNX32-DEST, pNubWtXgate, pNXgate21-3HA, pNXgate32-3HA) in der Hefe. CubPLV-Fusionen werden in den Hefestamm mit Matingtyp a (THY.AP4) und Nub-Fusionen in den Hefestamm mit Matingtyp α (THY.AP5) transformiert. Nach erfolgreichem Mating werden nun beide Proteine in einer Hefezelle exprimiert und eine Interaktion findet statt oder nicht.

Nach der Paarung (Mating) der beiden Hefestämme und erfolgter Interaktion der Testproteine kann diese durch Wachstum der gebildeten diploiden Kolonien auf Nährmedium ohne Histidin und Adenin nachgewiesen werden, denn die verwendeten Stämme können diese Aminosäuren nicht selbst synthetisieren (auxotrophe Mutanten). Zusätzlich kann die

erfolgreiche Interaktion mit Hilfe eines X-Gal Assays (Blaufärbung der Hefekolonien) belegt werden, wodurch die Expression des Reportergens *lacZ* nachgewiesen wird. In Abbildung 6 sind eine Proteininteraktion und deren Detektion beispielhaft gezeigt.

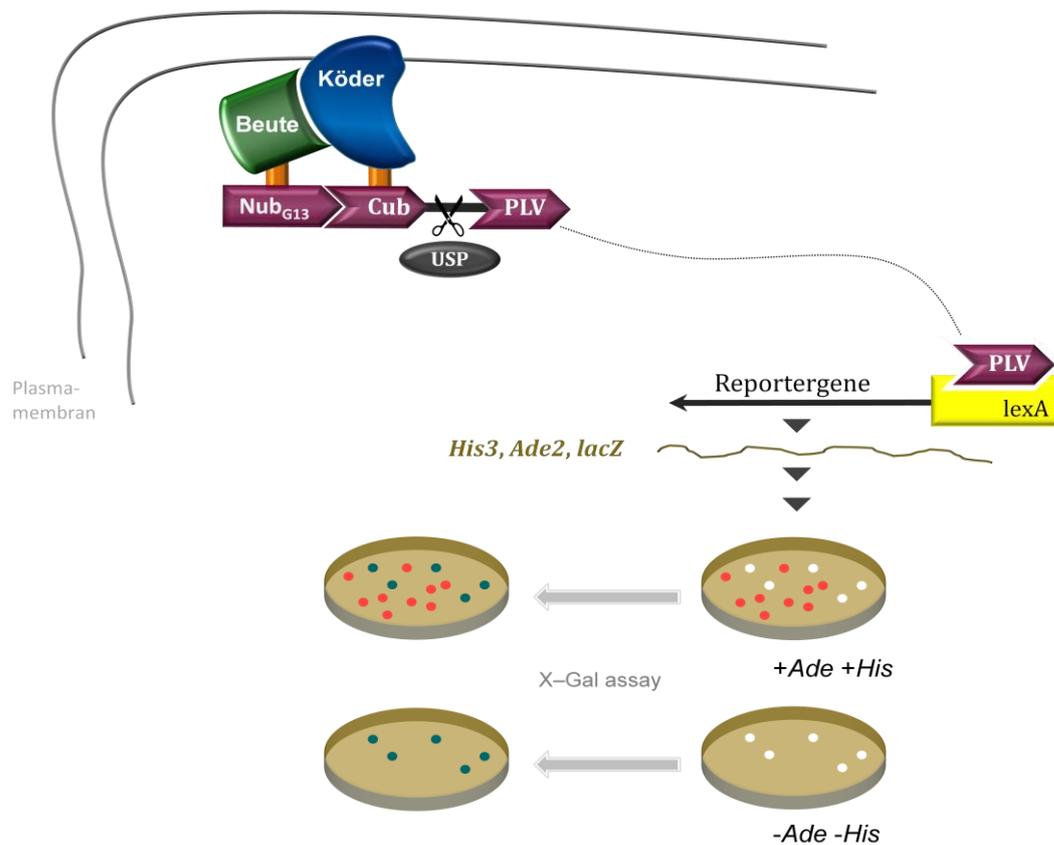


Abb. 6: Schematische Darstellung einer Interaktion und deren Detektion

Das in den CubPLV-Vektor zu klonierende Protein (Köder) sollte einen Membrananker besitzen, um eine ungewollte Wanderung in den Zellkern zu verhindern. Dies ist zum Beispiel bei einer Lokalisation in der Plasmamembran gegeben. Bei einer Interaktion des Testproteins und der damit erzwungenen räumlichen Nähe kommt es zur Zusammenlagerung der beiden Ubiquitinhälften und Erkennung des Hybrid-Ubiquitins durch die Ubiquitin-spezifische Protease (USP). Dadurch wird der synthetische Transkriptionsfaktor PLV (Protein A-lexA-VP16) abgespalten, wandert in den Zellkern und löst dort am *lexA*-Promotor die Transkription der Reportergene *his3*, *ade2* und *lacZ* aus. Die Detektion der Interaktion erfolgt nun durch die Fähigkeit der Hefezellen zum Wachstum auf Medium ohne Adenin und Histidin (weiße Kolonien) und kann durch die Blaufärbung der Kolonien nach einem X-Gal Assay bestätigt werden. Bei Wachstum auf Adenin- und Histidin-haltigem Medium erscheinen negative Interaktionsklone rot und lassen sich nicht durch einen X-Gal Assay (Blaufärbung) bestätigen.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Ausgehend vom Nachweis eines detergens-resistenten Komplexes des $G\alpha$ -Proteins mit Phospholipase A_2 in *Eschscholzia californica* sollten verschiedene Testsysteme zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner des pflanzlichen $G\alpha$ -Proteins genutzt beziehungsweise etabliert werden:

- Co-Immunpräzipitation von Proteinen mit einem $G\alpha$ -spezifischen Antikörper
- das mating-based Split-Ubiquitin System zur Detektion von Interaktionen von Proteinen aus *Arabidopsis* und *Eschscholzia* mit $G\alpha$ in Hefezellen.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung, Sequenzierung und Charakterisierung von Bindepartnern des $G\alpha$ -Proteins in *Arabidopsis* und *Eschscholzia*. Für diese Aufgabenstellung sollte das mating-based Split-Ubiquitin System genutzt und optimiert werden. Der auf diese Weise gewonnene Überblick könnte eine Abschätzung ermöglichen, in welche weiteren Signaltransduktionswege das pflanzliche $G\alpha$ -Protein eingreifen und / oder regulierend wirken kann.

Ferner wurden Erkenntnisse zum Mechanismus der Interaktion von $G\alpha$ mit seinen Effektorproteinen angestrebt, insbesondere bei dem aus *Eschscholzia* bekannten Interaktionspartner PLA_2 . Hierfür wurden Daten zur Beeinflussung der PLA_2 -Aktivität auf funktioneller Ebene angestrebt. Desweiteren sollten diese durch das Auffinden von PLA_2 -Bindepartnern mittels des mating-based Split-Ubiquitin Systems ergänzt werden, indem patatin-ähnliche Phospholipasen verschiedener Pflanzenspezies auf eine direkte Interaktion mit $G\alpha$ beziehungsweise $G\beta$ und $G\gamma$ getestet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem (Darmstadt, D)
GE Healthcare (Freiburg, D)
Grüssing (Filsum, D)
Invitrogen (Karlsruhe, D)
Merck (Darmstadt, D)
Roth (Karlsruhe, D)
Serva (Heidelberg, D)
Sigma (Aldrich, D)
VWR (Darmstadt, D)

2.2 Geräte

Die in dieser Arbeit genutzten Geräte und deren Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresesystem HE 33	GE Healthcare (Freiburg, D)
Analysenwaagen L2200P / H160 / R16P- [*] D1	Sartorius (Göttingen, D)
Autoklav Systec 2540ELV	Tuttnauer (Breda, NL)
Autoklav Varioklav 400E	H+P Labortechnik (Oberschleissheim, D)
Blender HGB2wt	Waring (Torrington; USA)
Blotter V10-SDB	Techne (Cambridge, UK)
Brutschrank & Hybridisierungs-ofen Enviro-Genie	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Digitalkamera Camedia E10	Olympus (Hamburg, D)
Electro Cell Manipulator 600	BTX (San Diego, USA)
Fluoreszenzscanner Storm 860	Molecular Dynamics (East Arques, USA)
Gefrierschrank	Liebherr (Kirchdorf, D)
Gefriertruhe	Sanyo (München, D)
Heizplatte Monotherm	Faust (Schaffhausen, CH)
Kühlschrank	Foron (Duisburg, D)
Lichtkasten Color Control	BIOTEC-Fischer (Reiskirchen, D)
Magnetrührer R3	MLW (Freital, D)
Microzentrifuge Force 7	Denver Instrument (Arvada, USA)
Microplate Fluoreszenz Reader FL _X 800	BioTek Instruments (Winooski, USA)
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories (Chantilly, USA)

Geräte	Hersteller
PCR Maschine Mastercycler <i>Gradient</i>	Eppendorf (Hamburg, D)
PCR Maschine Progene SI-1202	Techne (Cambridge, UK)
pH Meter pMX3000	WTW (Weilheim, D)
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem SE250	Hoefler Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Schüttelmaschine AK85	Novotron (Ludwigsburg, D)
Schüttelmaschine	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Schüttler KS500	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Spannungsgeber E443	Consort (Turnhout, B)
Spektrometer Ultrospec II / Genequant 1300	GE Healthcare (Freiburg, D)
Thermomixer comfort / 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Transilluminator C-20M	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Ultraschallgerät Sonoplus HD70	Bandelin (Berlin, D)
Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zellmühle ZM1000	Retsch (Haan, D)
Zentrifuge 3K12	Sigma (Osterode am Harz, D)
Zentrifuge K23D	MLW (Freital, D)
Zentrifuge 5403	Eppendorf (Hamburg, D)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
bis-BODIPY FL C ₁₁ -PC	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Glass beads, acid-washed	Sigma (Aldrich, D)
Hybond-ECL	GE Healthcare (Freiburg, D)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Freiburg, D)
illustra MicroSpin Columns	GE Healthcare (Freiburg, D)
LowCross Buffer	Candor Bioscience (Weißensberg, D)
Mikrotiterplatten (transparent / schwarz)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Ni Sepharose High Performance	GE Healthcare (Freiburg, D)
PD-10 Empty	GE Healthcare (Freiburg, D)
PD-10 Sephadex G-25M	GE Healthcare (Freiburg, D)
Protein A Sepharose	GE Healthcare (Freiburg, D)
Whatman Blotting Papier	GE Healthcare (Freiburg, D)

2.4 Kitsysteme

Verwendete Kitsysteme werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Kitsysteme

Kitsystem	Hersteller
2-D Clean-Up	GE Healthcare (Freiburg, D)
BCA Protein Assay – Reducing Agent Compatible	Thermo Scientific (Rockford, USA)
CloneMiner cDNA Library Construction	Invitrogen (Karlsruhe, D)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Freiburg, D)
pCR8/GW/TOPO TA Cloning	Invitrogen (Karlsruhe, D)
PolyATtract mRNA Isolation System	Promega (Mannheim, D)
QIAGEN Plasmid Midi	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick Gel Extraction	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy Plant Mini	Qiagen (Hilden, D)
Wizard Plus SV Minipreps	Promega (Mannheim, D)

2.5 Enzyme, Polymerasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: Verwendete Enzyme, Polymerasen

Enzyme	Hersteller
BP Clonase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
LR Clonase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Ribonuclease A (from bovine pancreas)	Sigma (Saint Louis, USA)
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega (Mannheim, D)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Polymerase	Hersteller
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega (Mannheim, D)
Taq DNA Polymerase	Segetic (Borken, D)

2.6 DNA-Fragmente

Alle verwendeten DNA-Fragmente sind in der Tabelle 7 aufgelistet und die Nukleotidsequenzen der Fragmente ohne angegebenen Genlocus sind im Anhang enthalten.

Tab. 7: DNA-Fragmente

DNA-Fragment	relevante Charakteristik	Genlocus
G α ¹	<i>Eschscholzia</i> , G-protein alpha Untereinheit, 1.152 bp	
GPA1	<i>Arabidopsis</i> , G-protein alpha Untereinheit, 1.152 bp	At2g26300
AGB1	<i>Arabidopsis</i> , G-protein beta Untereinheit, 1.134 bp	At4g34460
AGG2	<i>Arabidopsis</i> , G-protein gamma 2 Untereinheit, 303 bp	At3g22942
PhPatatin1 ¹	<i>Petunia</i> , patatin-ähnlich, 1.180 bp	
Phospholipase A IIA	<i>Arabidopsis</i> , 1.224 bp	At2g26560
14.3.3 ϵ	<i>Arabidopsis</i> , 765 bp	At1g22300
ADP-ribosylation factor A1E	<i>Arabidopsis</i> , 546 bp	At3g62290
arabinogalactan 12	<i>Arabidopsis</i> , 267 bp	At3g13520
thioredoxin 3	<i>Arabidopsis</i> , 357 bp	At5g42980
EST 337221 ¹	<i>Eschscholzia</i> , 319 bp	

¹ Die DNA-Sequenz ist im Anhang II enthalten.

2.7 Oligonukleotide

In der nachfolgenden Tabelle 8 sind alle für diese Arbeit benötigten Oligonukleotide aufgeführt. Sie wurden von der Firma Biomers (Ulm, D) bezogen und mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l verwendet.

Tab. 8: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')
<u>mbSUS / Gateway Klonierung, Insert-Überprüfung</u>	
SUS_G α Esch_B1_for	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg ggc tca ctc tgc</u>
SUS_G α Esch_B2_rev	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> taa tag acc tgc ga
SUS_G α _B1_for	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg ggc tta ctc tg</u>
SUS_G α _B2_rev	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tca taa aag gc
SUS_G β _B1_for	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg tct gtc tcc ga</u>
SUS_G β _B2_rev	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tca aat cac tc
G β _ostop_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> aat cac tct cc
SUS_G γ 2_B1_for	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg gaa gcg ggt agc t</u>
SUS_G γ 2_B2_rev	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tca aag aat gga gca gcc
G γ 2_ostop_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> aag aat gga gca gcc
SUS_pat_B1_for	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg gca aca gca atg tg</u>
SUS_pat_B2_rev	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tta ttt aga ggc ttt gct
pat-1_ostop_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> ttt aga ggc ttt gc

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')
pat_19–119_B1_for	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc gat gga ggt ggc att ag</u>
pat_19–119_B2_rev	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> atc ata ttt agg gcc cca
14.3.3_B1	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg gag aat gag agg gaa</u>
14.3.3_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tta gtt ctc atc ttg agg c
ADP_B1	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg ggt cta tcc ttc gg</u>
ADP_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> cta agc ctt gtt tgc gat
Arabino_B1	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg gag tca atg aag atg</u>
Arabino_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tta gaa gag aaa ccc tga
PLA2A_B1	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg caa atg gac agc c</u>
PLA2A_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tta gat cct aat tgg agc
PLA2A_ostop_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tca
Thio_B1	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg gcc gca gaa gga g</u>
Thio_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> tca agc agc agc aac aac
337221_B1	<u>aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc tgg taa cag tgt tga</u>
337221_B2	<u>tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta</u> gga cca ggt aaa agg
<u>Insert–Überprüfung, Sequenzierung</u>	
NubG_for	gga atc cct ggt ggg tc
3×HA_rev	agg aac atc gta tgg gta
<u>EST–Amplifikation</u>	
337221_for	tgg taa cag tgt tga gta tag
337221_rev	gga cca ggt aaa agg ttg aga

Die für die mbSUS / Gateway Klonierung notwendigen attB1 Linker, attB2 Linker, sind farblich unterstrichen dargestellt.

2.8 Plasmide

Plasmide, die Grundlage für diese Arbeit waren, sind in der Tabelle 9 aufgeführt:

Tab. 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz
pET-23a ⁽⁺⁾	Amp ^R , T7-tag, His-tag	Novagen (Disentis, CH)
pET-23a ⁽⁺⁾ + Gα	Amp ^R , T7-tag, His-tag, ORF von Gα (<i>E.c.</i>) in EcoRI / XhoI	Wieland Schwartze
U12585	pUni51 backbone, Kan ^R , ORF von GPA1	SSP Consortium
U68637	pUni51 backbone, Kan ^R , ORF von AGB1	SSP Consortium
U84515	pUni51 backbone, Kan ^R , ORF von AGG2	SSP Consortium
pGreen3K	Kan ^R , ORF von PhPatatin1 in SmaI	Richard Weerdestein
pDONR222	Kan ^R , Cm ^R , attP1/2, <i>ccdB</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pCR8	Spec ^R , attL1/2	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pMetYCGate ¹	Amp ^R , LEU2, met25, CEN4, B1/B2-Linker, Cub	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
pNubWtXgate ¹	Amp ^R , TRP1, ADH, 2μ, B1/B2-Linker, NubWt	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
pNXgate32-3HA ¹	Amp ^R , TRP1, ADH, 2μ, B1/B2-Linker, NubG, 3HA	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
pXNgate21-3HA	Amp ^R , TRP1, ADH, 2μ, B1/B2-Linker, NubG, 3HA	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
pNX32-DEST ¹	Amp ^R , Cm ^R , TRP1, ADH, 2μ, attR1/2, <i>ccdB</i> , NubG, 3HA	Prof. Frommer (Carnegie Institution, USA)
U12397	pUni51 backbone, Kan ^R , ORF von ADP–ribosylation factor	SSP Consortium

Plasmid	relevante Charakteristika	Referenz
U16332	pENTR/SD/D–TOPO backbone, Kan ^R , attL1/2, ORF von 14.3.3 ε	SSP Consortium
U15950	pENTR/SD/D–TOPO backbone, Kan ^R , attL1/2, ORF von thioredoxin 3	SSP Consortium
U16993	pENTR/SD/D–TOPO backbone, Kan ^R , attL1/2, ORF von arabinogalactan 12	SSP Consortium
U16519	pENTR/SD/D–TOPO backbone, Kan ^R , attL1/2, ORF von phospholipase A IIA	SSP Consortium

¹ Die Vektorkarte ist im Anhang III enthalten.

2.9 Antikörper

Die für diese Arbeit erforderlichen Antikörper sind in der Tabelle 10 aufgelistet:

Tab. 10: Verwendete Antikörper

Antiserum	Hersteller / Referenz	Verdünnung
<u>primär</u>		
rabbit–anti <i>Ga Arabidopsis</i> (P33)	Paul Millner (University of Leeds, UK)	1: 1.000
rabbit–anti <i>Ga Arabidopsis</i> (Tier82)	Isabella Hermann (IPK Gatersleben)	1: 1.000
His-tag (monoclonal)	Novagen (Madison, USA)	1: 1.000
VP16 (sc-7545, mouse monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	1: 100 1: 200
<u>sekundär</u>		
bovine anti–rabbit IgG–HRP (sc-2370)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	1: 3.000
goat anti–mouse IgG–HRP (sc-2031)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	1: 5.000

2.10 Mikroorganismen

2.10.1 *Escherichia coli*

Die verwendeten *E. coli*–Stämme sind in der Tabelle 11 beschrieben.

Tab. 11: *Escherichia coli*–Stämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
BL21	F– dcm ompT hsdS(rB– mB–) gal (DE3) BL21 (DE3 (pLysS) strain: F– dcm ompT hsdS(rB– mB–) gal (DE3) [pLysS CamR]a	Invitrogen (Karlsruhe, D)
<i>ccdB</i> Survival	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::Ptrc-ccdA	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Stamm	Charakteristika	Referenz
DH10B T1	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG tonA</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Mach1 T1	F- ϕ 80(<i>lacZ</i>) Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> (rK-mK+) Δ <i>recA1398</i> <i>endA1 tonA</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
XL1-Blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene (La Jolla, USA)

2.10.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die verwendeten *Saccharomyces*-Stämme sind in der Tabelle 12 beschrieben.

Tab. 12: *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	relevante Charakteristika	Referenz
THY.AP4	MATa <i>ura3 leu2</i> <i>lexA::lacZ::trp1</i> <i>lexA::HIS3</i> <i>lexA::ADE2</i>	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
THY.AP5	MAT α <i>URA3 leu2</i> <i>trp1</i> <i>his3</i> <i>loxP::ade2</i>	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004

2.11 Nährmedien

Im folgenden Abschnitt werden die zur Kultivierung der Mikroorganismen verwendeten Medien und Kulturbedingungen beschrieben.

Zur Herstellung fester Medien wurde Agar-Agar in einer Endkonzentration von 15 – 20 g/l zugegeben. Medien mit Zusatz von Antibiotika wurden bei 4 °C gelagert.

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in LB-Medium bei 37 °C.

<u>LB-Medium</u>	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 % (w/v) Pepton, tryptisch verdaut
	1 % (w/v) Natriumchlorid

Zur Selektion plasmid-tragender Bakterien erfolgte die Zugabe von Antibiotika:

Antibiotikum	Endkonzentration im Medium
Ampicilin	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

Antibiotika wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren und Abkühlen ins Medium gegeben.

Die Kultivierung zur Transformation bestimmter *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme erfolgte im Vollmedium (YPAD) bei 28 oder 30 °C.

<u>YPAD-Medium</u>	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Pepton, tryptisch verdaut
	2 % (w/v)	Glukose
	0,02 % (w/v)	Adenin

Dieses Medium wurde auch zum Resuspendieren der Zellen vor dem Mating genutzt, wobei hier auf die Zugabe von Adenin verzichtet wurde.

Um auf spezielle *S. cerevisiae*-Transformanden zu selektieren, wurde Medium mit Zusatz der entsprechenden Aminosäuren verwendet. Die Anzucht erfolgte ebenfalls bei 28 oder 30 °C.

<u>SC-Medium</u>	0,17 % (w/v)	Yeast Nitrogen Base (ohne AS und NH ₄)
	0,5 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	2 % (w/v)	Glukose
	0,15 % (w/v)	„AHTLUM“-DropOut Powder (Anhang IV)

Aminosäure	Endkonzentration im Medium
Adenin	20 µg/ml
Uracil	20 µg/ml
Tryptophan	20 µg/ml
Leucin	100 µg/ml
Histidin	20 µg/ml
Methionin	20 µg/ml

Aminosäuren wurden sterilfiltriert und vor dem Autoklavieren zum Medium gegeben.

2.12 Zellkultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Suspendierte Einzelzellen des einjährigen Kreuzblütlers Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*, Zelllinie PC 11, DSMZ (Braunschweig)) wurden in 4X Nährmedium (modifiziertes B5, Gamborg *et al.* (1968)) auf einem Rundschüttler (100 Upm) bei 24 °C und Dauerlicht (~7 Wmol/m²/s) in einem 9 / 10 Tage Wachstumszyklus kultiviert. Zur Zellernte wurde das 4X Medium durch ein Medium basierend auf Linsmaier und Skoog (1965, LS-Medium), welches die Phytohormone 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und α -Naphthalennessigsäure (jeweils 2 µM) enthielt, ersetzt und für 7 – 14 Tage angezogen. Die Zellen wurden abgesaugt, anschließend sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) nach Saiki *et al.* (1985) genutzt.

Dafür wurden Primer designt, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz 5'- und 3'-seitig eingrenzten. Zusätzlich konnten über diese Primer homologe Abschnitte, zum Beispiel attB1 und attB2, eingeführt werden, die für die spätere Klonierung von Bedeutung waren. Die einzelnen PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 oder 40 µl durchgeführt und ihre genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 13 angegeben.

Tab. 13: Pipettierschema für PCR-Reaktionen

Komponenten	Endkonzentration
Template	100 – 250 ng
10× PCR-Puffer	1×
dNTP Mix (10 mM)	0,1 mM
forward Primer (100 pM)	5 – 10 pM
reverse Primer (100 pM)	5 – 10 pM
Polymerase (1 U/µl; 3 U/µl)	0,5 – 1,5 U

Ablauf einer Amplifikation unter Standardbedingungen:

Initialdenaturierung	94 °C	5:00 min
30 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	0:45 min
Annealing	x ¹ °C	0:30 min
Elongation	72 °C	x ² min
terminale Elongation	72 °C	5:00 min

Im Anschluss an die Reaktion wurde der PCR-Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

¹ Die Temperatur für die Anlagerung des zu amplifizierende Fragments richtete sich nach den Nukleotidsequenzen des verwendeten Primerpaars.

² Die Dauer der DNA-Synthese richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments und der Syntheserate der Polymerase.

Ablauf einer Amplifikationen mit attB1 und attB2 Überhängen:

Initialdenaturierung	94 °C	5:00 min
10 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	0:45 min
Annealing	50 °C	0:30 min
	-0,5°C	
Elongation	72 °C	2:00 min

26 Zyklen:

Denaturierung	94 °C	0:45 min
Annealing	45 °C	0:30 min
Elongation	72 °C	2:00 min
terminale Elongation	72 °C	10:00 min

Im Anschluss an die Reaktion wurde der PCR-Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

2.13.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme und dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Fermentas (St.Leon-Rot, D) bezogen.

Der Verdau wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

- 0,5 – 3 µg Vektor-DNA
 - 1/10 des Gesamtvolumens 10× Reaktionspuffer
 - 1/10 des Gesamtvolumens RNase A (0,2 mg/ml; Zugabe optional)
 - 0,5 – 2 U Restriktionsenzym (BsrGI; EcoRI; HindIII; PstI; SmaI)
- Auf das Endvolumen von 10 – 20 µl wurde mit bidest. H₂O aufgefüllt.

Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.13.3 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Um eine Religation linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurde sie mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) behandelt.

Die Dephosphorylierung wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

- 1 – 2 µg Vektor-DNA
- 1 – 2 U SAP (1 U/µl)
- 1/10 des Gesamtvolumens Reaktionspuffer (10×)

Auf das Endvolumen von 20 µl wurde mit bidest. H₂O aufgefüllt.

Der Ansatz wurde für 15 min bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und das Enzym anschließend unter den angegebenen Bedingungen inaktiviert. Die Ansätze wurden danach weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.13.4 Ligation

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten und dephosphorylierten Vektor wurde ein molares Verhältnis von 1:1 gewählt und nach folgendem Protokoll angesetzt:

- 50 ng Vektor–DNA
- 50 ng DNA–Fragment
- 1/10 des Gesamtvolumens Ligasepuffer (10×)
- 5 U T4 DNA–Ligase (5 U/μl)

Auf das Endvolumen von 20 μl wurde mit bidest. H₂O aufgefüllt.

Der Ansatz wurde für 5 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und das Enzym anschließend unter den angegebenen Bedingungen inaktiviert. Die Ligationsansätze wurden danach weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.13.5 Agarose–Gelelektrophorese

2.13.5.1 Auftrennung von DNA

DNA–Fragmente mit einer Größe von 20 kb bis 300 bp können über ihre Größe mittels Elektrophorese in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt werden. 1× TAE–Puffer diente als Laufpuffer und der Gellösung wurde nach Abkühlen und vor dem Gießen noch 0,1 μg/ml Ethidiumbromid, zum Sichtbarmachen der DNA, zugesetzt. Bevor die Gele mit den jeweiligen Proben geladen werden konnten, wurden sie mit 1/10 des Auftragsvolumens Ladepuffer (10×) versetzt. Die angelegte Spannung von 100 – 120 V und die Laufzeit von 30 min bis 1 h richteten sich nach der Größe der verwendeten Gele. Als Längenstandard diente SmartLadder von Eurogentec (Köln, D), welcher in Abbildung 7 dargestellt ist. Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten DNA–Fragmente durch Bestrahlung mit UV–Licht (320 nm) sichtbar gemacht und mittels einer Digitalkamera dokumentiert. Um bestimmte Fragmente klonieren und sequenzieren zu können, mussten sie ausgeschnitten und aus dem Agarosegel extrahiert werden (siehe 2.13.6).

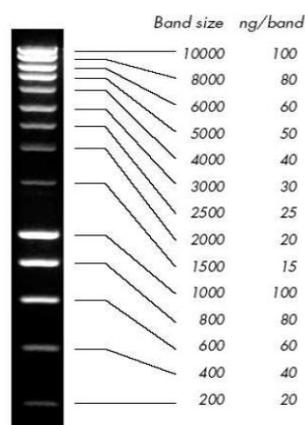


Abb. 7: Verwendeter Längenstandard SmartLadder

Dargestellt ist das aufgetrennte Bandenmuster von 10.000 – 200 bp. Rechts sind die entsprechenden Konzentrationen in ng/Bande angegeben, wenn 5 μl aufgetragen wurden (Eurogentec, Köln, D).

Ethidiumbromid–Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
1 %iges DNA–Agarosegel	1 % (w/v) Agarose in 1× TAE–Puffer; aufgekocht und nach dem Abkühlen Ethidiumbromid zugesetzt

50× TAE-Puffer (pH 8,5)	242 g/l	Tris
	5,8 % (v/v)	Eisessig
	37,2 g/l	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
10× DNA-Ladepuffer	20 % (w/v)	Ficoll 400
	0,1 M	Na ₂ EDTA, pH 8
	1 % (v/v)	SDS
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol

2.13.5.2 Auftrennung von RNA

Auch RNA kann mittels Elektrophorese und 1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt werden. Im Allgemeinen wird dies genutzt, um die Qualität isolierter RNA beurteilen zu können.

Der Gellösung wurde nach Abkühlen und vor dem Gießen noch 0,01 µg/ml Ethidiumbromid und 35 % Formaldehyd zugesetzt. Damit die Proben besser in die Geltaschen laufen, wurden sie mit 1/5 des Auftragsvolumens an Ladepuffer (5×) versetzt. Die Gelelektrophorese wurde anschließend unter dem Abzug und bei einer maximalen Spannung von 70 V durchgeführt, da Gel sowie Laufpuffer Formaldehyd enthalten.

Ethidiumbromid-Stammlösung	1 mg/ml Ethidiumbromid	
1,2 %iges RNA-Agarosegel	1,2 % (w/v) Agarose in 10× MOPS und DEPC-H ₂ O; Aufkochen und nach Abkühlen Zugabe von Ethidiumbromid und 35% Formaldehyd (37 %)	
DEPC-H ₂ O	bidest. H ₂ O + 0,1 % DEPC	
10× MOPS (pH 7,0)	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA (Dinatriumsalz)
10× RNA-Laufpuffer	10 % (v/v)	MOPS 10×
	2 % (v/v)	Formaldehyd (37 %)
	88 % (v/v)	DEPC-H ₂ O
5× RNA-Ladepuffer	0,8 % (v/v)	0,5 M EDTA
	7,2 % (v/v)	Formaldehyd (37 %)
	20 % (v/v)	Glycerin
	30 % (v/v)	Formamid
	40 % (v/v)	MOPS 10×
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol	

2.13.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des Kits QIAquick Gel Extraction von Qiagen (Hilden, D). Alle Zentrifugationen erfolgten bei 10.000 Upm und die genaue Zusammensetzung der Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

Entsprechenden DNA-Banden wurden aus einem 1 %igen Agarosegel ausgeschnitten und anschließend gewogen. Zu je 100 mg Gel wurden 300 µl Lösung QG pipettiert und das Gel bei 50 °C und unter Schütteln in circa 10 min, abhängig von der Gelgröße, aufgelöst. Danach erfolgte eine Zugabe von je 100 µl Isopropanol zu 100 mg gelöstem Gel. Die gutgemischte

DNA-Lösung wurde zur Bindung auf eine QIAquick Spin Säule aufgebracht und diese für 1 min zentrifugiert. Dann folgte ein Waschschrift, bei dem 750 µl der Lösung PE auf die Säule gegeben wurde, worauf sich abermals eine Zentrifugation für 1 min anschloss. Um verbliebenes Ethanol zu entfernen, wurde erneut für 2 min zentrifugiert. Abschließend konnte die DNA mit 30 µl bidest. H₂O, nach einer Einwirkzeit von 5 min (RT) und einer einminütigen Zentrifugation, eluiert werden. Die so erhaltene DNA wurde entsprechend weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.13.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur quantitativen Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wurde diese bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrometer mittels UV-Strahlung vermessen. Eine OD₂₆₀ von eins entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg DNA/ml Lösung. Zusätzlich konnte die Verunreinigung der DNA durch Proteine mittels des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt werden. Dieser Wert sollte bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.13.8 Klonierung in pCR8 für Sequenzierung

Um die Sequenz bestimmter DNA-Abschnitte zu erhalten und charakterisieren zu können, wurden sie in einen Vektor kloniert und somit vermehrt. In dieser Arbeit wurde dazu der pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen (Karlsruhe, D) genutzt.

Die Taq Polymerase hat eine terminale Transferase Aktivität, welche einen Adenosin-Überhang an das 3'-Ende von PCR-Produkten anfügt. Der im Kit enthaltene linearisierte, Gateway kompatible Vektor pCR8 hat dementsprechend einen Thymidin-Überhang, was eine effiziente Ligation von PCR-Fragmenten, mittels kovalent gebundener Topoisomerase I, zulässt.

Ligationsansatz: 0,5 – 4 µl PCR-Fragment
 1 µl Vektor pCR8 (5 – 10 ng/µl)
 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)

Auf das Endvolumen von 6 µl wurde mit bidest. H₂O aufgefüllt.

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde der Ansatz entsprechend weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

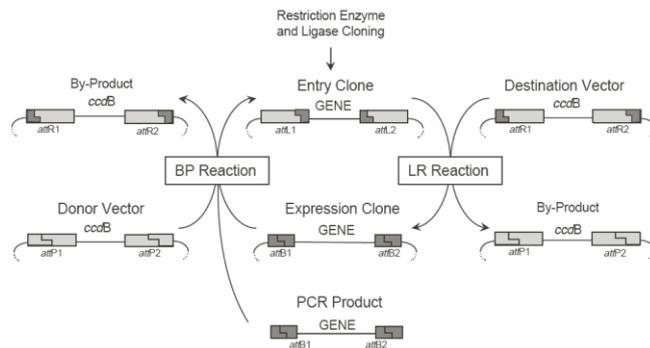


Abb. 8: Schematische Darstellung der Gateway Technologie

Überblick aller Klonierungsmöglichkeiten mittels BP und LR Reaktion. (Instruction Manual, <http://www.lifetech.com/gateway>).

2.13.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder bestimmter Plasmidabschnitte wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und Versendung richteten sich nach den Firmenangaben.

Nachfolgende Sequenzvergleiche mit dem zu beinhaltenden DNA-Fragment erfolgten mit Hilfe des PC-Programms Clone Manager 6 von Sci Ed Central (Cary, USA) und der Internetprogramme von TAIR (The Arabidopsis Information Resource: <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>; <http://www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp>), NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und PGN (Plant Genome Network: http://pgn.cornell.edu/blast/blast_search.pl).

2.14 Herstellung einer cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana*

2.14.1 RNA-Isolierung

Für die Herstellung einer cDNA-Bank ist es unerlässlich, reine und möglichst unbeschädigte RNA zu extrahieren. Hierfür wurde der RNeasy Plant Mini von Qiagen (Hilden, D) genutzt, alle verwendeten Materialien waren RNase-frei und es wurde immer auf Eis gearbeitet!

Vier Gramm frisches *Arabidopsis thaliana* Zellkulturmaterial wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen und mit 450 µl RLT Puffer versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 56 °C für 3 min. Zellreste wurde durch Auftrag auf eine QIAshredder Säule und einer anschließenden Zentrifugation abgetrennt. Der Durchfluss wurde mit ½ Volumen absolutem Ethanol versetzt und die ausgefallenen Nukleinsäuren mittels Zentrifugation an die RNeasy Mini Säule gebunden. Die Reinigung der RNA erfolgte durch mehrere Wachschriffe mit Puffer RW1 und RPE und nach Zugabe von 30 – 50 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation wurde diese von der Säule eluiert.

Für die Quantifizierung der erhaltenen RNA, wurde sie bei einer Wellenlänge von 260 nm, wie schon unter Abschnitt 2.13.7 beschrieben, vermessen. Allerdings entspricht hierbei eine OD_{260} von eins, einer Konzentration von 40 μg RNA/ml Lösung. Die Reinheit der RNA wurde mittels des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt, wobei dieser bei reiner RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte. Zum visuellen Qualitätsnachweis erfolgte eine Auftrennung mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.13.5.2). Da isolierte RNA relativ instabil ist, wurde sie sofort weiterverwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

2.14.2 mRNA-Isolierung

Der nächste Schritt zur Herstellung einer cDNA-Bank bestand in der Abtrennung der mRNA von der gesamten RNA, wofür das PolyATtract mRNA Isolation System III von Promega (Mannheim, D) genutzt wurde. Mit diesem Kit können kleinere Mengen totaler RNA (0,1 – 1 mg) für die Isolierung verwendet werden.

Das Trennprinzip beruht auf der hochaffinen Bindung des für mRNA charakteristischen poly-Adenylat-Terminus an Biotin-Oligo(dt) Primer, die wiederum an Streptavidin-Paramagnetic Partikel (SA-PMPs) binden. 1 mg totale RNA wurde auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und mit biotinylierten Oligo(dt) Primern versetzt. Zum Fangen der Oligo(dt)-mRNA Hybride wurden diese zu gewaschenen SA-PMPs gegeben und mit Hilfe eines magnetischen Ständers separiert. Die Partikel wurden anschließend mehrmals vorsichtig gewaschen und anschließend die reine mRNA mit 100 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Es folgte die Bestimmung der Konzentration sowie der Reinheit und aus Stabilitätsgründen wurde die mRNA sofort weiterverwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die genaue Durchführung und die Namen und Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

In dieser Arbeit wurde mRNA auch zur Suche von patatin-ähnlichen Genen und zur Amplifikation von *Eschscholzia californica* „Expressed Sequenced Tags“ (ESTs) genutzt. Hierfür wurde sie mittels der Reversen Transkriptase M-MuLV von Fermentas (St. Leon-Rot, D) in cDNA umgeschrieben und als PCR-Template eingesetzt.

2.14.3 CloneMiner cDNA Library Construction

Für die eigentliche Herstellung der cDNA-Bank wurde der CloneMiner cDNA Library Construction Kit von Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet. Es standen zwei Vorgehensweisen zur Auswahl, wobei die nicht radioaktive cDNA-Markierung gewählt wurde. Alle dafür

notwendigen Arbeitsschritte orientierten sich an der Arbeitsanleitung des Herstellers.

Für die Erst-Strang Synthese mit Hilfe von attB2-Oligo(dt) Primern und der SuperScript II Reversen Transkriptase wurden 5 µg isolierte mRNA eingesetzt. Dann folgte die Zweit-Strang Synthese mittels DNA Polymerase, Ligase und RNase H, woran sich die Ligation der attB1 Linker anschloss. Um unligierten Linker oder sehr kleine cDNAs unter 500 bp zu entfernen und die Größen der cDNAs zu fraktionieren, wurde diese über eine Sephacryl S-500 HR Säule (Invitrogen, D) gegeben. Die Konzentration der attB-flankierenden cDNA in den einzelnen Fraktionen wurde bestimmt, die mit den höchsten Konzentrationen gepoolt, gefällt und mittels der BP Clonase Reaktion in den Vektor pDONR222 kloniert. Abschließend erfolgte die Transformation der cDNA-beinhaltenen Vektoren in den *E. coli*-Stamm DH10B T1. Die so erhaltene cDNA-Bank wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Wichtige Kriterien für die Qualität der hergestellten cDNA-Bank ist die Anzahl der Transformanden, die Prozentzahl der Positiven (Klone mit Insertbande) und deren Größe. Dazu wurden 45 Klone in LB_{Kan}-Medium angezogen, ihre Plasmid-DNA extrahiert und mit dem Restriktionsenzym BsrGI verdaut (siehe 2.13.4). Das Plasmid pDONR222 besitzt zwei Restriktionsschnittstellen in den att-Adapterbereichen des Inserts, das somit herausgeschnitten wird. Durch die anschließende Trennung des linearisierten Plasmids und des Inserts mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.13.5.1) konnten positive Transformanden und auch die Größen der einzelnen cDNA-Fragmente ermittelt werden. Zur Bestimmung des Titers (cfu, „colony forming units“) wurden festgelegte Konzentrationen der Bank ausplattiert, die gewachsenen Klone ausgezählt und in die nachfolgende Gleichung, eingesetzt:

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Kolonien pro Platte} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ausplattiertes Volumen (ml)}}$$

Der Titer jeder Platte wurde anschließend genutzt, um die Zahl an Kolonie formenden Einheiten der gesamten cDNA-Bank zu ermitteln, die zwischen 5×10^6 und 1×10^7 liegen sollte. Die erzeugte cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* hatte einen Titer von $2,475 \times 10^7$ cfu/ml und 86,7 % Transformanden mit einer durchschnittlicheren Insertgröße von 1.110 bp. Es wurde auch auf eine bereits bestehende cDNA-Bank von *Eschscholzia californica* zurückgegriffen, welche einen Titer von 7×10^5 cfu/ml und eine durchschnittliche Insertgröße von 1.350 bp aufwies (Heinze *et al.*, 2007).

2.15 Herstellung einer cDNA-Expressionsbank von *Arabidopsis thaliana* und *Eschscholzia californica*

Die Voraussetzungen zur Herstellung einer cDNA-Expressionsbank sind zum einen eine qualitativ gute cDNA-Bank und zum anderen ein entsprechender Expressionsvektor. In dieser Arbeit konnte auf eine bestehende *Eschscholzia californica* cDNA-Bank (Heinze *et al.*, 2007) zurückgegriffen werden. Während die cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana*, wie unter Abschnitt 2.14 beschrieben, selbst hergestellt wurde. Als Expressionsvektor diente hierbei pNX32-DEST, welcher von Prof. Frommer (Carnegie Institution, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

An die Vermehrung der cDNA-Banken schlossen sich die Isolierung der Plasmide und eine Konzentrationsbestimmung an. Daraufhin erfolgte die Klonierung von je 100 ng Plasmid-DNA mittels LR Clonase (Invitrogen, D) in den, mit Hilfe des Restriktionsenzym PstI linearisierten, Expressionsvektor. Danach wurden die cDNA-beinhaltenen Vektoren in den *E. coli*-Stamm DH10B T1 transformiert (Vorgehensweise wie beim CloneMiner cDNA Library Construction Kit). Zur besseren Handhabung wurde die cDNA-Expressionsbank aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Kriterien für die Qualität der hergestellten cDNA-Expressionsbank sind identisch mit denen einer cDNA-Bank (siehe 2.14.3). Zur Bestimmung der positiven Transformanten und deren Größen wurden hier allerdings je 60 Klone in LB_{Amp}-Medium angezogen, ihre Plasmid-DNA extrahiert und mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut. Die erzeugten cDNA-Expressionsbanken wiesen einen Titer von $1,98 \times 10^6$ cfu/ml, 66,7 % Transformanten mit einer durchschnittlicheren Insertgröße von 997 bp für *Arabidopsis thaliana* und einen Titer von $3,6 \times 10^5$ cfu/ml, 61,7 % Transformanten mit einer durchschnittlicheren Insertgröße von 1.012 bp für *Eschscholzia californica* auf.

2.16 Transformation von *Escherichia coli*

2.16.1 Herstellung elektrokompentener *E. coli*-Zellen

Zuerst wurde eine Vorkultur des jeweiligen Stammes (XL1-Blue, TOP10, BL21) angesetzt. Dafür wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie (fraktionierter Ausstrich der Stämme auf LB-Platten) oder mit etwas Material einer Glycerinkultur (10 % Glycerin, Lagerung bei -80 °C) beimpft und anschließend über Nacht, mit einer Temperatur von 37 °C und 160 Upm

inkubiert. Zum Ansetzen der Hauptkultur wurden 500 ml LB-Medium mit der Vorkultur und einer OD₆₀₀ von 0,08 – 0,1 angeimpft. Anschließend wurde diese bis zum Erreichen der optischen Dichte von 0,5 – 0,7, unter den schon oben angegebenen Bedingungen, inkubiert. Zur Bestimmung der OD₆₀₀ wurde die Hauptkultur 1 : 1 mit Medium verdünnt und im Photometer vermessen. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 15 min abzentrifugiert (4.000 ×g), mehrmals mit dem gleichen Volumen an sterilem, eiskaltem bidest. H₂O resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach der Aufnahme in 10 %iger Glycerinlösung wurden die nun kompetenten Zellen auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zu ihrem Gebrauch gelagert.

2.16.2 Elektroporation

Hierfür wurden aliquotierte, elektrokompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA dazu pipettiert. Der Ansatz ruhte für etwa 10 min auf Eis bevor er vorsichtig und unter Vermeidung von Blasenbildung in eine vorgekühlte Küvette (0,2 cm) transferiert wurde. Die eigentliche Transformation erfolgte mit Hilfe eines Elektroporators bei 2,45 kV, 129 Ω und einem Pulse von 5 msec. Nach der raschen Zugabe von 250 µl SOC-Medium und vorsichtigem Mischen, inkubierten die transformierten Zellen zur Expression ihrer erhaltenen Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C und 600 Upm. Zur Selektion der positiven Transformanden wurde der Ansatz auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Trypton
	10 mM	Natriumchlorid
	2,5 mM	Kaliumchlorid
	10 mM	Magnesiumchlorid
	10 mM	Magnesiumsulfat
	20 mM	Glukose

2.16.3 Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

Das Ansetzen der Vorkultur erfolgte wie schon unter Abschnitt 2.16.1 beschrieben. Zum Ansetzen der Hauptkultur wurden 500 µl der Vorkultur zu 100 ml LB-Medium pipettiert und dieses anschließend auf dem Schüttler (160 Upm) bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,3 inkubiert. Um die OD der Hauptkulturen zu bestimmen, wurden sie 1 : 1 mit Medium verdünnt bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer vermessen. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert (5.000 Upm), in 25 ml kalter Lösung A resuspendiert und für 1 h auf Eis stehen gelassen. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation

(5.000 Upm) bei 4 °C für 10 min an und das erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml kalter Lösung B aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen wurden auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zu ihrem Gebrauch gelagert.

Lösung A	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	Calciumchlorid
	100 mM	Kaliumchlorid
	50 mM	Manganchlorid
	15 % (v/v)	Glycerin
Lösung B	10 mM	MOPS pH 7,0
	75 mM	Calciumchlorid
	10 mM	Kaliumchlorid
	15 % (v/v)	Glycerin

2.16.4 Hitzeschock

Hierfür wurden aliquotierte, hitzekompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA dazu pipettiert. Der Ansatz ruhte für etwa 10 min auf Eis bevor er für 35 s bei 42 °C, mit einer anschließenden Ruhephase von 2 min auf Eis, inkubiert wurde. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.16.2) und vorsichtigem Mischen, schüttelten die transformierten Zellen zur Expression ihrer erhaltenen Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C und 600 Upm. Um auf positive Transformanden zu selektieren, wurde der Ansatz auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.17 Plasmid-Isolierung

2.17.1 aus *E. coli* mittels Alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979)

Diese Isolierung wurde vorwiegend genutzt um schnell und vor allem kostengünstig viele Transformanden, auf ihre erfolgreiche Klonierung hin, überprüfen zu können.

Fünf ml LB-Medium plus entsprechendes Antibiotikum wurden mit Zellmaterial einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Zur Zellernte wurden 1,5 ml der Kultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und die Zellen durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm vom Medium getrennt. Der Überstand wurde verworfen und der vorangegangene Schritt noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die pelletierten Bakterienzellen in 100 µl Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert. Nach Zusatz von 200 µl Lösung 2 wurde der Ansatz durch vorsichtiges Invertieren (5×) gemischt. Anschließend erfolgte das Ausfällen der Proteine durch Zugabe von 150 µl Lösung 3. Die Suspension wurde wieder durch vorsichtiges Invertieren (5×) gemischt und für 5 min auf Eis

inkubiert. Daraufhin wurden die ausgefallenen Proteine und Zellbestandteile durch eine Zentrifugation für 8 min bei RT und 13.000 Upm von der Lösung getrennt. Der Überstand wurden vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zum Ausfällen der Nukleinsäuren wurde die Suspension mit 450 µl Isopropanol versetzt, gemischt und danach bei RT und 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde vorsichtig mit 100 µl 70 %igem Ethanol durch Zentrifugation bei 13.000 Upm und RT für 5 min gewaschen. Der überstehende Ethanol wurde komplett entfernt und die DNA an der Luft getrocknet. Abschließend wurde sie in 30 µl 50 °C warmen bidest. H₂O gelöst, weiteren Analysen unterzogen oder bei -20 °C eingefroren.

Lösung 1	50 mM	Glukose
	10 mM	EDTA (pH 8)
	25 mM	Tris-HCl (pH 8)
Lösung 2	0,2 M	Natriumhydroxid
	1 % (w/v)	SDS
Lösung 3	5 M	Kaliumacetat

2.17.2 aus *E. coli* mittels Wizard Plus SV Minipreps

Um Plasmid-DNA für eine Sequenzierung verwenden zu können, erfolgte deren Isolierung mit Hilfe des Kits Wizard Plus SV Minipreps von Promega (Mannheim, D).

Fünf ml LB-Medium plus entsprechendes Antibiotikum wurden mit einer Kolonie (fraktionierter Ausstrich auf LB-Platte) oder mit etwas Material der Glycerinkultur (10 % Glycerin, Lagerung bei -80 °C) beimpft und anschließend über Nacht, mit einer Temperatur von 37 °C und 160 Upm inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte, wie schon unter 2.17.1 beschrieben. Zu den pelletierten Zellen wurden 250 µl Cell Resuspension Solution gegeben und diese durch Vortexen vollständig resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 250 µl Cell Lysis Solution, die Suspension wurde gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Damit die freigesetzte DNA nicht abgebaut werden kann, wurde eine Alkaline Protease Solution (10 µl) zugegeben. Es wurde erneut gründlich gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm (RT) und der erhaltene Überstand wurde auf eine Säule pipettiert. Dann schloss sich eine weite Zentrifugation für 1 min bei 13.000 Upm an. Um die nun an die Säule gebundene DNA zu reinigen, wurden 750 µl Column Wash Solution auf diese gegeben und für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Zum Trocknen der DNA wurde erneut Column Wash Solution (250 µl) auf die Säule pipettiert und diese für 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Zum Abschluss konnte die Plasmid-DNA eluiert werden, indem 40 µl 50 °C warmes bidest. H₂O direkt auf die Säulenmembran

gegeben und diese für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert wurde. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren. Die Zusammensetzung der Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

2.17.3 aus *E. coli* mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit

Wenn große Mengen Plasmid-DNA benötigt wurden, erfolgte deren Isolierung mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits von QIAGEN GmbH (Hilden, D).

Fünf ml LB-Medium plus entsprechendes Antibiotikum wurden mit einer Kolonie (fraktionierter Ausstrich auf LB-Platte) oder mit etwas Material der Glycerinkultur (10 % Glycerin, Lagerung bei -80 °C) beimpft und anschließend für 8 Stunden, mit einer Temperatur von 37 °C und 160 Upm inkubiert. Zur Hauptkultur von 100 ml wurde 1/500 an Vorkultur gegeben und diese über Nacht (12 – 16 h) bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. Die Zellernte erfolgte bei 6.000 ×g für 15 min und 4 °C. Die weitere Vorgehensweise orientierte sich am Herstellerprotokoll. Die pelletierten Zellen wurden mit Hilfe verschiedener Puffer resuspendiert und aufgeschlossen. Proteine und Zellreste wurden abgetrennt, die Plasmid-DNA an eine Säule gebunden und gewaschen. Zur Elution der DNA wurde ein großes Volumen (5 ml) verwendet, was eine anschließende Fällung mit Isopropanol nötig machte. Mit einer angemessenen Menge (40 – 100 µl) an bidest. H₂O erfolgte die eigentliche Aufnahme der DNA. Abschließend wurde die Konzentration der so erhaltene Plasmid-DNA, bestimmt (siehe 2.13.7), diese danach weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren. Die Zusammensetzung der Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

2.17.4 aus *S. cerevisiae* mittels der „Lazy bones“ Methode (verändert nach Kaiser *et al.*, 1994)

Voll- oder Selektionsmedium wurde mit je einer transformierten *S. cerevisiae*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 160 Upm inkubiert. Von diesen Übernachtskulturen wurden je 2× 1,5 ml bei 5.000 ×g für 5 min pelletiert und in 400 µl DNA release solution durch Vortexen resuspendiert. Dann erfolge eine Zugabe von 300 µl Glass beads (acid-washed), 400 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und Vortexen der Suspension für jeweils eine Minute. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm und RT wurde die obere wässrige Phase mit 400 µl Isopropanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen und die DNA für 10 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde sie in 20 µl 50 °C bidest. H₂O aufgenommen, zur Transformation elektrokompeter *E. coli*-Zellen genutzt oder bei -20 °C gelagert.

DNA release solution	2 % (v/v) Triton X-100
	1 % (v/v) SDS
	100 mM Natriumchlorid
	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM Na-EDTA

2.18 Proteinüberexpression und Aufreinigung

Der entsprechende Expressionsklon wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert und eine Kolonie in 40 ml LB-Medium bei 37 °C und 160 Upm über Nacht angezogen. Zum Ansetzen von einem Liter Hauptkultur wurde diese mit der gesamte Vorkultur versetzt und anschließend auf dem Schüttler (160 Upm) bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 – 0,5 inkubiert. Um die OD der Hauptkultur zu bestimmen, wurden sie 1 : 1 mit Medium verdünnt und bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer vermessen. Nun folgte eine Induktion der Proteinexpression mit 1 M IPTG (1 mM Endkonzentration) für 3 h bei 35 °C. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert (5.000 Upm) und in 2 ml Bindepuffer pro Gramm Pelletfeuchtgewicht resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurde die Zellsuspension mit Lysozym (1 : 1.000, 100 mg/ml) versetzt und eine Minute mit Ultraschall behandelt. Nach der Zugabe von RNase A (1 : 2.000, 100 mg/ml) erfolgte zum Abtrennen der Zelltrümmer vom Proteinrohextrakt eine Zentrifugation für 30 min bei 100.000 ×g und 4 °C. Für die Reinigung des überexprimierten His-getagten Proteins wurde 1 ml Ni Sepharose High Performance mit je 4 ml Proteinrohextrakt versetzt. Die Ni Sepharose wurde zuvor in eine PD-10 Säule überführt, mit 5 ml bidest. H₂O gewaschen und mit 10 ml Bindepuffer equilibriert. Danach wurde der Proteinrohextrakt–Sepharose–Mix für mindestens 3 Stunden bei 8 °C und 250 Upm inkubiert. Durch Gravitationsfluss und anschließendes Versetzen mit 2× 10 ml Bindepuffer wurden die restlichen Proteine von den Gebundenen getrennt und diese gewaschen. Das Abtrennen des überexprimierten Proteins von der Ni Sepharose High Performance erfolgte mit 2× 2,5 ml Elutionspuffer. Anschließend wurde das Eluat über eine PD-10 Sephadex G-25M Säule entsalzen, in 1× PBS aufgenommen, dabei ankonzentriert und bei 4 °C gelagert. Die genutzte Ni Sepharose High Performance Säule wurde nach Angaben des Herstellers regeneriert und wiederverwendet.

Bindepuffer (pH 7,4)	20 mM Tris
	500 mM Natriumchlorid
	1 % (v/v) Triton X-100
	10 % (v/v) Glycerin
	10 mM 2-Mercapto-ethanol
	45 mM Imidazol
	1× Protease Inhibitor Cocktail Set 1 (100×), frisch zugeben

Elutionspuffer (pH 7,4)	20 mM	Tris
	500 mM	Natriumchlorid
	1 % (v/v)	Triton X-100
	10 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	2-Mercapto-ethanol
	500 mM	Imidazol
1× PBS (pH 7,5 / H 9,5)	137 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	10 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	2 mM	Kaliumdihydrogenphosphat

2.19 Proteinextrakte von *Saccharomyces cerevisiae* (Volland *et al.*, 1994)

Zur biochemischen Analyse der gesamten Proteine einer *S. cerevisiae*-Kultur erfolgte deren Extraktion wie bei Volland *et al.* (1994) beschrieben.

Nach einer photometrischen Bestimmung der Zelldichte wurden 4×10^7 ($OD_{600} = 1,3$) oder 8×10^7 Zellen bei 5.000 Upm für 5 min pelletiert. Durch Resuspendieren (Vortexen) der Zellen in 500 µl 0,2 M NaOH / 0,2 % 2-Mercapto-ethanol und einer Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte die Zellyse. Zum Ausfällen der Proteine wurde Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 10 % zugesetzt, gründlich gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die so entstandenen Präzipitate konnten durch eine Zentrifugation bei 12.000 Upm für 10 min pelletiert, anschließend mit 100 µl kaltem Aceton (12.000 Upm, 5 min) gewaschen und für 10 min bei RT getrocknet werden. Nach der Aufnahme der gefällten Proteine in 70 µl 2× SDS-Probenpuffer (ohne Bromphenol, plus 4 mM EDTA) und 30 µl 1 M Tris (pH 6,8), schloss sich eine Inkubation für 10 min bei 37 °C an, bevor 0,5 oder 1×10^7 Zellen, zur weiteren Analyse, auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen (siehe 2.21.4) wurden.

2× SDS-Probenpuffer	4 % (w/v)	SDS
	0,1 M	Tris/HCl (pH 6,8)
	20 % (v/v)	Glycerin
	2 % (v/v)	2-Mercapto-ethanol
	4 mM	EDTA

2.20 Fraktionierung pflanzlicher Zellen

2.20.1 Zellaufschluss und fraktionierende Zentrifugation

Zum Aufschließen und zur Gewinnung zellulärer Fraktionen von Zellen aus Suspensionskultur wurden 80 g eingefrorenes Zellmaterial (siehe Abschnitt 2.12) zusammen mit dem doppelten Volumen Trockeneis grob gemörsert und anschließend in einer Zelmühle oder einem Blender fein zermahlen. Das erhaltene Trockeneis-Zellen-Gemisch wurde mit 100 ml kaltem Proteinextraktionspuffer (plus ½ Tablette Protease Inhibitor Cocktail Set 1) versetzt,

unter Rühren (RT) langsam aufgetaut und danach in einem Glashomogenisator behandelt. Zur Erzeugung subzellulärer Fraktionen erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 2.000 Upm und 4 °C, der resultierende Überstand wurde erneut für 30 min bei 14.300 Upm und 4 °C zentrifugiert. Eine letzte Zentrifugation dieses Überstandes für 60 min bei 100.000 ×g und 4 °C erbrachte die Fraktionen „100.000 ×g Überstand“ und ein Pellet, die „mikrosomale Fraktion“. Das Pellet wurde mit Suspensionspuffer ab gespült und schließlich durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert (unterschiedliche Volumina). Die Fraktionen lagerte bis zur Weiterverwendung bei -20 °C (Überstand) beziehungsweise -80 °C (mikrosomales Pellet). Zum Anreichern von Plasmamembranproteinen wurde das Verfahren der Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System mit Saccharose angewandt (Abschnitt 2.20.2).

Proteinextraktionspuffer (pH 7,5)	50 mM	MOPS
	330 mM	Saccharose
	5 mM	Na ₂ EDTA
	1 mM	PMSF
	5 mM	DTE
	5 mM	Ascorbinsäure
	0,6 % (w/v)	Polyclar AT
Suspensionspuffer (pH 7,5)	4 mM	Dikaliumhydrogenphosphat
	1 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	5 mM	Kaliumchlorid
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	DTE
	330 mM	Saccharose

2.20.2 Anreicherung der Plasmamembran durch Verteilung im wässrigen 2-Phasen-System

Um Plasmamembran zu gewinnen, erfolgte die Durchführung des wässrigen 2-Phasen-Systems mit Saccharose. Zur Steigerung der Plasmamembranreinheit wurde dieses System dreimal durchlaufen und demzufolge mussten drei 36 g Systeme hergestellt werden, deren genaue Zusammensetzung in Tabelle 14 dargestellt ist (Dordschbal, 2002).

Das Ausgangsmaterial bestand aus einer oder zwei mikrosomalen Fraktionen, die mit Suspensionspuffer auf ein Volumen von 9 ml gebracht und nochmals mit Hilfe eines Glashomogenisators aufgeschlossen wurden. Eines der vorbereiteten 2-Phasen-Systeme wurde mit der Vesikelsuspension versetzt, zu den anderen beiden wurden je 9 ml Suspensionspuffer pipettiert und anschließend alles kräftig geschüttelt (vortexen). Eine Zentrifugation bei 4 °C und 2.000 Upm für 10 min führte zur Trennung in Ober- und Unterphase, wobei die Oberphase vorsichtig abgenommen wurde. Dies musste 2× wiederholt werden, so dass die Vesikelsuspension alle drei Systeme durchlaufen konnte. Danach erfolgte die Vereinigung der drei Oberphasen und eine 1 : 1 Verdünnung mit Suspensionspuffer. Es

schloss sich eine Zentrifugation für 1 Stunde bei $36.900 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ an. Die so gewonnenen Pellets wurden in 10 ml Suspensionspuffer vereinigt und erneut zentrifugiert. Je nachdem wie groß das so entstandene Pellet war, wurde es in $300 - 1.000 \text{ } \mu\text{l}$ TENC resuspendiert und über Nacht bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 Upm solubilisiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 60.000 Upm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 40 min wurde die Proteinkonzentration des Überstandes (= solubilisierte Plasmamembran) bestimmt, dieser aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ zur weiteren Verwendung gelagert.

Tab. 14: Zusammensetzung eines 36 g Systems

		36 g System
	Saccharose	3,05 g
	bidest. H ₂ O	4,91 ml
	200 mM Kaliumphosphat	0,675 ml
	200 mM Kaliumchlorid	0,675 ml
	10 mM EDTA	0,27 ml
	100 mM DTE	0,27 ml
	20 % (w/w) Dextran T-500	11,7 g
	40 % (w/w) PEG 3350	5,85 g
<hr/>		
Suspensionspuffer (pH 7,5)	4 mM	Dikaliumhydrogenphosphat
	1 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	5 mM	Kaliumchlorid
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	DTE
	330 mM	Saccharose
TENC (pH 7,5 / pH 9,5)	20 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA
	50 mM	Natriumchlorid
	0,5 % (w/v)	Na-Cholat

2.21 Biochemische Methoden

2.21.1 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit dem BCA Protein Assay – reducing agent compatible der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA).

Dazu wurde die Probe mit bidest. H₂O oder dem entsprechendem Probenpuffer auf $25 \text{ } \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach der Zugabe von $25 \text{ } \mu\text{l}$ Compatibility Reagent wurde für 15 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Daran schloss sich die Zugabe von 1 ml BCA-WR und eine weitere Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min an. Abschließend erfolgte die Messung mittels eines Photometers bei einer

Optischen Dichte von 562 nm gegen den ebenso behandelten Blindwert (bidest. H₂O oder Probenpuffer). Die Proteinkonzentration wurde durch den Vergleich der Optischen Dichte mit einer Eichkurve, welche zuvor mit festgelegten Konzentrationen von BSA (Rinderserumalbumin) erstellt wurde, ermittelt. Die Zusammensetzung und Vorbereitung der einzelnen Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

2.21.2 Co-Immunpräzipitation

Diese Methode wurde eingesetzt, um Interaktionsproteine mit Hilfe eines Antikörpers detektieren zu können. Der Antikörper (AK) bindet sein spezifisches Antigen an dem sich Bindepartner befinden und der gesamte Proteinkomplex wird dann von den restlichen, nicht bindenden Proteinen, getrennt. Hierfür wurde Protein A Sepharose eingesetzt, da Protein A (aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*) mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline bindet.

Unterschiedliche Konzentrationen an solubilisierten Plasmamembranvesikeln (sPMV) wurden langsam aufgetaut, mit dem entsprechenden Puffer auf ein Endvolumen von 400 µl gebracht, desweiteren mit bis zu 3 µl einer 1 : 200 Verdünnung Antikörper P33 (erkennt die G-Protein alpha Untereinheit) versetzt und für 3 h unter Schütteln (200 Upm) bei 8 °C inkubiert. Währenddessen wurden 100 – 200 µl Protein A Sepharose in ein illustra MicroSpin Column überführt und diese 3× mit 400 µl 1× PBS durch Zentrifugation (30 sec bei 1.000 Upm) gewaschen. Die gewaschene Protein A Sepharose wurde in 200 µl 1× PBS aufgenommen und mit der sPMV-AK Suspension versetzt. Daran schloss sich eine weitere Inkubation für 2 bis 16 Stunden bei 8 °C und 200 Upm an. Durch Zentrifugation (30 sec bei 1.000 Upm) der Säule wurden die nichtgebundenen Proteine abgetrennt und als „Durchfluss“ für weitere Untersuchungen eingesetzt. Es schlossen sich ein bis drei Waschschrte mit je 400 µl 1× PBS an, die ebenfalls aufgefangen und für weiter Untersuchungen eingesetzt wurden. Zum Trennen der Protein-AK-Protein A Komplexe von der Sepharose erfolgte eine erneute Zugabe von 1× PBS und eine fünfminütige Erhitzung des Gemisches auf 95 °C. Währenddessen konnten die Proteinkomplexe aufgefangen und durch eine letzte Zentrifugation vollständig von der Sepharose abgetrennt werden. Die so erhaltenen Proteine wurden nun durch Auftrag auf ein SDS-Proteingel ihrer Größe nach aufgetrennt, angefärbt, ausgeschnitten und mit Hilfe von Massenspektrometrie identifiziert.

1× PBS (pH 7,5 / pH 9,5)	137 mM Natriumchlorid
	2,7 mM Kaliumchlorid
	10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
	2 mM Kaliumdihydrogenphosphat

2.21.3 Proteinfällung

Zur Ankonzentrierung von Proteinen, zum Beispiel nach einer Co-Immunpräzipitation, wurde der 2-D Clean-Up Kit von GE Healthcare (Freiburg, D) verwendet. Pro Ansatz konnten hier bis zu 100 µg Proteine gefällt und in einem kleineren Volumen, zum Auftrag auf ein SDS-Proteingel, aufgenommen werden.

Nach Zugabe von 300 µl Precipitant, Inkubation auf Eis und einer weiteren Zugabe von 300 µl Co-Precipitant folgte eine Zentrifugation bei 12.000 ×g, 4 °C für 5 min. Danach wurden die gefällten Proteine mit 40 µl Co-Precipitant gewaschen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde es in 25 µl bidest. H₂O vom Rand des Eppendorfgefäßes gelöst und in 1 ml Wash Buffer plus 5 µl Wash Additive vollständig resuspendiert. Nach einer halbstündigen Inkubation bei -20°C wurden die Proteine bei 12.000 ×g, 4 °C und 5 min pelletiert und abschließend in der benötigten Lösung und dem notwendigen Volumen aufgenommen. Die Zusammensetzung der Lösungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

2.21.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Diese Gelelektrophorese dient zur Analyse von Proteingemischen durch Auftrennung nach ihrer Molekülgröße. Dafür werden die Proteine zuvor mit DTE behandelt, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Die weitere Behandlung mit SDS hat ebenfalls eine Denaturierung und Aufbruch von Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Folge. Außerdem lagert sich SDS an Proteine an und es bilden sich negativ geladene SDS-Proteinkomplexe. Dadurch ist eine gleichmäßige Wanderung der Komplexe im elektrischen Feld zum Plus-Pol gewährleistet. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wird durch den Molekularsiebeffekt erzielt, der durch die Dichte und den Grad der Vernetzung der Polyacrylamid-Gelmatrix hervorgerufen wird.

Das in dieser Arbeit verwendete diskontinuierliche SDS-Elektrophorese-System (12,5 %ig) nach Laemmli (1970), mit Tris-Glycin und Tris/HCl Puffern, basiert auf einem großporigen Sammelgel, welches über ein kleinporiges Trenngel geschichtet ist (die Zusammensetzungen sind in Tabelle 15 angegeben). Die unterschiedlichen Porengrößen und die verschiedenen pH-Werte der Gele bewirken, dass sich die Proteine zunächst im Sammelgel konzentrieren und dann erst ins Trenngel einlaufen, in dem die eigentliche Auftrennung der SDS-Proteinkomplexe erfolgt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 4×SDS-Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1×) und 5 min bei 95 °C denaturiert. Für die Elektrophorese wurde 1×Laufpuffer verwendet und sie erfolgte bei einer Spannung von

100 V – 120 V. Als Molekulargewichtsstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot, D) verwendet, welcher in Abbildung 9 dargestellt ist.

Tab. 15: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidlösung	1,2 ml	7 ml
bidest. H ₂ O	4,8 ml	5,2 ml
Sammelgelpuffer	2 ml	–
Trenngelpuffer	–	4,4ml
20 % (w/v) SDS	80 µl	–
10 % (w/v) APS	64 µl	75 µl
TEMED	15 µl	16 µl

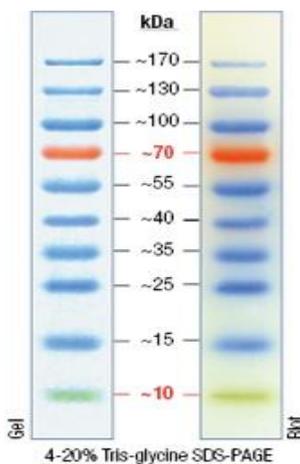


Abb. 9: Längenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder

Dargestellt ist das aufgetrennte Bandenmuster von 170 kDa – 10 kDa nach einer 4 – 20 %igen SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese (Fermentas, St. Leon-Rot, D).

Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl
Trenngelpuffer (pH 8,8)	2 M Tris/HCl
10× Laufpuffer (pH 8,3)	0,25 M Tris 2,5 M Glycin 1 % (w/v) SDS
4× SDS–Probenpuffer (pH 6,8)	0,2 M Tris/HCl 8 % (w/v) SDS 4 % (v/v) 2-Mercapto-ethanol 40 % (v/v) Glycerin 0,08 % (w/v) Bromphenolblau 0,02 M DTE, frisch zugesetzt

2.21.5 SYPRO Ruby Proteinfärbung in SDS–Gelen

Im Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine konnten mittels SYPRO Ruby von Invitrogen (Karlsruhe, D) angefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Dafür wurde das Gel zunächst 2× für je 30 min in Fixierungslösung geschwenkt. Danach erfolgte die Behandlung mit unverdünnter SYPRO Ruby Lösung im Dunkeln und über Nacht. Zum vollständigen Entfernen überschüssiger Färbelösung wurde das Gel 2× für je 30 min in Waschlösung geschwenkt. Bevor die angefärbten Proteinbanden mit blauer Fluoreszenz im Scanner dokumentiert werden konnte, wurde das Gel mindestens 3× 10 min in bidest. H₂O geschüttelt.

Fixierungslösung	40 % (v/v)	Methanol
	7 % (w/v)	Essigsäure
Waschlösung	10 % (v/v)	Methanol
	7 % (w/v)	Essigsäure

2.21.6 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Mit SYPRO Ruby angefärbte Proteinbanden wurden ausgeschnitten und zur Sequenzierung Dr. Angelika Schierhorn (Max–Planck–Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung; Halle, D) übergeben. Die Proteinproben wurden anschließend durch Trypsin in Peptide gespalten, diese im MALDI–Reflektor–Flugzeit–Massenspektrometer REFLEX II (Bruker Daltonik; Bremen, D) analysiert und die so erhaltenen Aminosäuresequenzen im Mascot Programm (<http://www.matrixscience.com>) gegen eine Datenbank abgeglichen.

2.21.7 Semidry–Blotting

Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung konnten die Proteine aus dem SDS–Gel auf eine geeignete Trägermatrix transferiert werden. Dafür wurde in dieser Arbeit eine Nitrocellulosemembran genutzt. Das Gel inkubierte bis zum Zusammenbau des Blots in Puffer 2. Blottingpapier wurde passend zugeschnitten und mit den entsprechenden Puffern getränkt. Neun Lagen Puffer 3–Papier wurden luftblasenfrei auf die Kathodenplatte gelegt und die Membran darauf platziert. Über das danach aufgelegte Polyacrylamidgel wurden luftblasenfrei drei Lagen Puffer 2–Papier gelegt und abschließend folgten noch sechs Lagen Puffer 1–Papier. Die Proteine wurden nun auf elektrophoretischem Weg, für 2 Stunden bei 50 mA, auf die Membranoberfläche transferiert und interagierten mit dieser durch hydrophobe Wechselwirkungen. Währenddessen blieb die Anordnung der Proteine im Gel erhalten und das an den Proteinen angelagerte SDS wurde ausgewaschen. Daher können die Proteine teilweise renaturieren und ihre Sekundär– und Tertiärstruktur wiedererlangen.

Puffer 1 (pH 10,4)	300 mM	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
Puffer 2 (pH 10,4)	25 mM	Tris/HCl
	20 % (v/v)	Methanol
Puffer 3 (pH 10,4)	25 mM	Tris/HCl
	20 % (v/v)	Methanol
	40 mM	γ -Aminocapronsäure
	0,01 % (v/v)	SDS

2.21.8 Fast Green Proteinfärbung auf Nitrocellulosemembranen

Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran für 10 min in 20 ml Fast Green Färbelösung leicht geschwenkt. Danach wurde die Färbelösung entfernt und die Membran 5× für je 10 min mit bidest. H₂O gewaschen. Die Proteine waren nun grün angefärbt und konnten mittels Digitalfotographie dokumentiert werden. Durch anschließendes fünfminütiges Schütteln in 20 ml 0,02 M NaOH kam es zu einer Entfernung der Färbung und bevor die Membran weiterverwendet werden konnte, wurde diese mindestens 3× für 10 min in bidest. H₂O geschüttelt.

Färbelösung 0,1 % Fast Green, in 1 % Essigsäure

2.21.9 Immunologischer Nachweis

Der immunologische Nachweis von auf Nitrocellulosemembranen immobilisierten Proteinen beruht auf der hochspezifischen Erkennung von Antigenen durch Antikörper. Um eine unspezifische Anlagerung des Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde diese zuvor über Nacht bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde sie 3× für 10 min in TBS–T geschüttelt, dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (eingesetzte Verdünnung siehe Tabelle 10, in LowCross Buffer) inkubiert und anschließend 3× für 10 min mit TBS–T gewaschen. Nun folgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur (eingesetzte Verdünnung siehe Tabelle 10, in LowCross Buffer) und anschließend wurde ebenfalls 3× für 10 min mit TBS–T gewaschen. Bevor die nachzuweisenden Proteine detektiert werden konnten, wurde die Membran dreimal für 10 min in bidest. H₂O gewaschen. Die Detektion wurde mit Hilfe des ECL Western Blotting Detection Reagents der Firma GE Healthcare (Freiburg, D) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die eigentliche Detektion erfolgte in einer Dunkelkammer und der dafür notwendige Entwickler sowie der Fixierer stammten von der Firma Kodak (Rochester, USA). Die gebundenen Antikörper konnten durch Behandlung (30 min bei 56 °C) mit RotiFree der Firma Roth (Karlsruhe, D) von der Membran entfernt und diese erneut zum immunologischen Nachweis eingesetzt werden.

Blockierungslösung	10 % (v/v)	RotiBlock von Roth (Karlsruhe, D), in bidest. H ₂ O
TBS-T	20 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	137 mM	Natriumchlorid
	0,1 % (v/v)	Tween 20

2.21.10 Ni Sepharose High Performance Bindungsassay

In ein illustra MicroSpin Column wurden 100 µl „leerer“ Sepharose High Performance (Erzeugung siehe Regeneration des Mediums in den Herstellerangaben) pipettiert und diese mit NiSO₄ Lösung „benickelt“. So konnten unterschiedliche Bindekapazitäten der Säule eingestellt werden. Zum Beispiel wurde eine Kapazität von 12 µg, durch die Zugabe von 480 µl 1mM NiSO₄, erreicht. Die Sepharose wurde vor und nach der Nickelzugabe je 2× mit 600 µl bidest. H₂O gewaschen (30 sec, 1.000 Upm). Für den eigentlichen Assay wurden die so hergestellten Säulen mit 600 µl Bindepuffer equilibriert und dann mit der Probe, zum Beispiel überexprimiertes, His-getagtes Protein, für 5 min unter Schütteln (160 Upm) inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 sec bei 1.000 Upm wurde der Durchfluss, zur späteren Analyse, aufgefangen und das Protein-Sepharose Gemisch 3× mit 400 µl Bindepuffer gewaschen. Diese Waschfraktionen wurden gegebenenfalls in späteren Analysen eingesetzt. Nun konnte das gebundene Protein vollständig, durch Zugabe von 2× 200 µl Elutionspuffer oder Nickelentferner, von der Säule eluiert und mittels ELISA (siehe nächster Abschnitt) untersucht werden oder es erfolgte eine weitere Probenzugabe mit anschließender Inkubation bei 8 °C. Hierbei konnte es sich um ein weiteres überexprimiertes Protein oder solubilisierete Plasmamembranvesikel handeln. Zuvor erfolgte die Abdeckung freier Bindungsstellen mit 400 µl Blockpuffer. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden nach gründlicher Reinigung mit Bindepuffer (3× 400 µl) von der Säule eluiert (2× 200 µl Elutionspuffer oder Nickelentferner), über ein SDS-Gel aufgetrennt und entsprechende Proteinbanden mittels Massenspektrometrie analysiert. Das Protein-Sepharose-Gemisch, wurde auch, nach gründlicher Reinigung mit Bindepuffer (3× 400 µl) und Aufnahme in 1× PBS, direkt für eine Messung der Phospholipase A₂-Aktivität (siehe 2.22) eingesetzt.

Blockpuffer	1× PBS + 3% (w/v) RSA
Bindepuffer (pH 7,4 / 9,5)	20 mM Tris
	500 mM Natriumchlorid
	1 % (v/v) Triton X-100
	10 % (v/v) Glycerin
	10 mM 2-Mercapto-ethanol
	45 mM Imidazol

Elutionspuffer (pH 7,4 / 9,5)	20 mM	Tris
	500 mM	Natriumchlorid
	1 % (v/v)	Triton X-100
	10 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	2-Mercapto-ethanol
	500 mM	Imidazol
Nickelentferner (pH 7,4)	20 mM	Trinatriumphosphat
	500 mM	Natriumchlorid
	50 mM	EDTA
1× PBS (pH 7,5 / H 9,5)	137 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	10 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	2 mM	Kaliumdihydrogenphosphat

2.21.11 ELISA

Mit Hilfe des ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) können Proteine in einer Probe nachgewiesen werden, dabei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an das nachzuweisende Antigen binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert und die dadurch katalysierte Reaktion dient als Nachweis des Antigens. Denn das Enzym setzt ein Substrat um und das entstandene Reaktionsprodukt kann durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Pro Well einer Mikrotiterplatte inkubierten 90 µl einer Antigenlösung für 2 h unter Schütteln oder über Nacht in Ruhe bei 4 °C. Nach Bindung der Proteine an die Mikrotiterplatte wurde die restliche Antigenlösung mit Schwung abgekippt, die Platte auf Filterpapier ausgeschlagen und 3× mit je 200 µl 1× PBS waschen. Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation mit je 200 µl Blockpuffer für eine Stunde Raumtemperatur. Danach wurde die Platte erneut auf Filterpapier ausgeschlagen und 3× mit je 200 µl 1× PBS gewaschen. Die Bindung des primären Antikörpers (eingesetzte Verdünnung siehe Tabelle 10, in Blockpuffer) wurde mittels Zugabe von 100 µl Antikörperlösung plus einer Inkubation für 1 h bei RT durchgeführt und durch 5× Waschen mit je 200 µl 1× PBS-T beendet. Bei der Bindung des sekundären Antikörpers („horse radish peroxidase-labeled“) wurde ebenso vorgegangen. Zum vollständigen Entfernen des nichtgebundenen Antikörpers wurde 2× mit 200 µl 1× PBS und anschließend 2× mit 200 µl bidest. H₂O gewaschen. Zur Farbentwicklung wurden 100 µl ABTS Lösung pro Well zugegeben und diese nach einer Ruhephase von 30 min im Microplate Reader MRX, bei einer Wellenlänge von 415 nm, vermessen. Die so erhaltenen Messwerte konnten mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA) ausgewertet werden.

1× PBS (pH 7,5)	80 mM Dinatriumhydrogenphosphat × 2H ₂ O 20 mM Natriumdihydrogenphosphat × H ₂ O 1,5 M Natriumchlorid
Blockpuffer	1× PBS + 3% (w/v) RSA
PBS-T	1× PBS + 0,1% (v/v) Tween 20
ABTS Lösung	0,4 mg/ml ABTS (lichtempfindlich!) in 100 mM Citronensäuremonohydrat (pH 4,5), aliquotieren und bei -20 °C lagern, vor Gebrauch mit 1 : 1.000 H ₂ O ₂ (35% v/v) versetzen

2.22 Messung der Phospholipase A₂-Aktivität

Für die Aktivitätsmessung des Enzyms Phospholipase A₂ (PLA₂) wurde das Substrat bis-BODIPY FL C₁₁-PC der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet. Die Funktionsweise dieser Methode beruht auf der Spaltung des Substrates, einem fluorogenen Phospholipid. Dessen beide Fettsäureketten in sn1- und sn2-Position tragen an ihren freien Enden ein BODIPY-Fluorophor. Durch die räumliche Nähe im Phospholipid kommt es zu einer gegenseitigen Fluoreszenzauslöschung (Quench). Wenn durch die Phospholipase A-Aktivität eine Fettsäure abgespalten wird, hebt sich der Quencheffekt auf, denn es entstehen fluoreszierende Fettsäure und fluoreszierendes Lysophosphatidylcholin (LPC). Da diese Endprodukte sowohl bei der Hydrolyse in sn1- als auch in sn2-Position entstehen, ist keine Differenzierung zwischen der Aktivität von PLA₁ und PLA₂ möglich.

Der Feststoff lagerte bei -20 °C, nachdem er in absolutem Ethanol aufgenommen wurde. Für jeden Messversuch musste die Substratlösung (80 mM oder 1 M Endkonzentration, in Messpuffer) frisch, unter dreimaliger Behandlung mit Ultraschall für je 5 sec, hergestellt und bis zur Verwendung kühl und dunkel gelagert werden. Zur Probenvermessung wurde eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte genutzt und pro Well 20 µl Probe vorgelegt. Als immer mitgeführte Positivkontrolle diente *Bee venom* PLA₂ mit einer Konzentration von 400 ng pro Ansatz. Nach einer, vom jeweiligen Experiment abhängigen, Inkubationszeit bei 8 °C und 200 Upm wurde jedem Well 230 µl Substratlösung zugegeben und nach Rütteln der Platte für 2 sec im Fluoreszenzreader diese kontinuierlich über einen Zeitraum von bis zu 10 min gemessen ($\lambda_{Ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 515 \text{ nm}$, Sensitivität = 40 oder 60). Die Messung startete immer etwa 30 sec nach Substratzugabe. Dieser Zeitraum wurde vernachlässigt und der erste Messwert als Nullwert angesehen. Von den so erhaltenen Rohdaten wurden die mitgeführten Kontrollen abgezogen und die Messwerte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA) dokumentiert und dargestellt. Zur Angabe der Enzymaktivität in % wurden zuerst alle Messreihen Baseline-corrected, was bedeutet, dass der Wert zum Zeitpunkt t=0 von den anderen Werten der Messreihe abgezogen wird. Desweiteren wird in den gezeigten Abbildungen nur ein Messzeitpunkt angegeben, wobei

eine Messreihe als 100% festgelegt wird und sich die Prozentwerte auf die gleiche Proteinkonzentration beziehen.

Messpuffer (pH 7,0)	20 mM	Tris
	0,02 % (w/v)	CHAPS

2.23 mating-based Split-Ubiquitin System „mbSUS“ (Obrdlik *et al.*, 2004)

Diese Methode wurde entwickelt um Interaktionen zwischen löslichen Proteinen aber auch Membranproteinen zu identifizieren und stellt eine Weiterentwicklung des 2-Hybrid Systems dar. Hier dient ein gespaltener Transkriptionsfaktor zur Identifizierung von Interaktionen, die auch noch im Zellkern intakt sein müssen. Das Split-Ubiquitin System nutzt dagegen Ubiquitinhälften, um auch Interaktion, zum Beispiel an der Plasmamembran oder im Zellplasma detektieren zu können. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten mating-based Split-Ubiquitin System, welches 2004 von Petr Obrdlik veröffentlicht wurde, ist es möglich PCR-Produkte, *in vivo* in spezielle Vektoren zu klonieren und Proteininteraktionen durch Mating zu identifizieren. Durch die vektorintegrierten att Rekombinationsstellen (Gateway Technologie; Hartley *et al.*, 2000) ist die Klonierung einfach durchzuführen. Und die Expression der „bait“-Proteine (Klonierung in Vektor pMetYCGate) kann mittels eines Methionin-regulierbaren Met25 Promotors gesteuert werden. Nach Bindung von „bait“- und „prey“-Protein wird der fusionierte Transkriptionsfaktor PLV abgespalten und einer Expression der Gene *his3*, *ade2*, *lacZ* initiiert, was eine Identifizierung positiver Interaktionen durch Wachstum auf Medium ohne Adenin und Histidin und nach Durchführung eines X-Gal Assays ermöglicht.

2.23.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mittels der Lithium-Acetat-Methode (verändert nach Schiestl und Gietz, 1989)

Bei der Transformation von *S. cerevisiae* wurde die High-Efficiency-Lithium-Acetat-Methode (verändert nach Schiestl und Gietz, 1989) angewendet. Dafür wurden 5 ml YPAD-Medium mit einer Kolonie (fraktionierter Ausstrich der Stämme) oder mit etwas Material einer Glycerinkultur (20 % Glycerin, Lagerung bei -80 °C) der zu transformierenden Stämme THY.AP4 und THY.AP5 beimpft und über Nacht bei 28 °C und 160 Upm inkubiert. Zum Ansetzen der Hauptkultur wurden 100 ml Vollmedium mit der Vorkultur und einer OD₆₀₀ von 0,08 – 0,1 angeimpft. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei 30 °C, bis eine optische Dichte von 0,6 erreicht war. Zur Bestimmung der OD wurde die Hauptkulturen 1 : 1 mit Medium verdünnt und im Photometer vermessen. Die Zellen wurden durch

fünfminütige Zentrifugation bei 2.500 Upm geerntet, in 5 ml bidest. H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Wasser wurde entfernt und die Zellen mit 2,5 ml LiAc/TE gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das LiAc/TE entfernt, die Zellen in 500 µl LiAc/TE aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Wenn die kompetenten Zellen später verwendet wurden, lagerten sie solange bei 4 °C.

Für die eigentliche Transformation wurden 20 µl Heringssperma (zuvor für 3 min auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt), 20 µl DNA-Mix (Plasmid-DNA (0,1 – 10 µg) oder lineares Plasmid (100 ng) plus Insert (>100 ng) in 1× TE), 4,5 µl 1 M LiAc, 50 µl kompetente Zellen und 300 µl PEG/LiAc gut gemischt und für 20 min bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 20 min bei 42 °C. Nach einer letzten einminütigen Zentrifugation bei 7.000 Upm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die transformierten Zellen in 100 µl bidest. H₂O resuspendiert, auf entsprechendes Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurden Klone im entsprechenden Selektivmedium angezogen, ihre Plasmide isoliert und diese in elektrokompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Plasmide mussten nun erneut isoliert werden und konnten dann mittels PCR und Verdau mit Restriktionsendonukleasen auf den Inhalt des jeweiligen DNA-Fragments überprüft werden, bevor die positiven Klone erneut in *S. cerevisiae* transformiert wurden, um im weiteren Assay eingesetzt zu werden.

10× TE (pH 7,5)	100 mM 10 mM	Tris/HCl EDTA
LiAc/TE	1× 100 mM	TE (10×) Lithiumacetat (LiAc)
PEG/LiAc	1× 100 mM 50 % (v/v)	TE (10×) Lithiumacetat (LiAc) PEG (50 %)

2.23.2 Mating und Interaktionstests

Klone der beiden *Saccharomyces cerevisiae* Stämme THY.AP4 (Matingtyp a) und THY.AP5 (Matingtyp α), die ihre zu testenden Fragmente in den entsprechenden Vektoren enthielten, wurden über Nacht in 5 ml ihres Selektionsmediums angezogen. Je nachdem wie dicht die Übernachtskulturen waren, wurden 1 – 3 ml bei 2.000 Upm für 5 min abzentrifugiert und in 100 – 300 µl YPD-Medium resuspendiert. Wenn die Ausgangszellsuspensionen nicht zu dünn sind, ist das Mating effizienter.

Interaktionstest zweier Proteine

Beim diesem Test wurden je 10 µl der beiden Matingtypen gemischt, wobei sich, bei einer großen Anzahl von zu testenden Interaktionen, die Verwendung einer Mikrotiterplatte anbot. Drei Mikroliter der gemischten Zellsuspensionen wurden vorsichtig auf eine YPD-Platte getropft und für 6 Stunden bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die gemaiteten Zellen mittels replica plating auf eine SC-Platte plus Adenin und Histidin übertragen und 2 – 3 Tage bei 30 °C auf diploide Zellen selektiert. Durch eine weitere Übertragung (replica plating), der nun diploiden Zellen, auf eine SC-Platte ohne Adenin und Histidin und einer anschließende Inkubation von bis zu neun Tagen bei 28 °C, konnten Interaktionen der getesteten Proteine durch Wachstum nachgewiesen werden.

Interaktionstest zur Interaktionspartnersuche innerhalb von cDNA-Expressionsbanken

Beim dem in dieser Arbeit optimierten Interaktionstest zur Suche nach Interaktionspartnern innerhalb der cDNA-Expressionsbanken von *E. californica* und *A. thaliana* erfolgte eine Transformation von 9,66 µg Plasmid-DNA der jeweiligen cDNA-Expressionsbank in den Hefestamm THY.AP4. Danach wurden Übernachtkulturen angezogen, entsprechendes Volumen abzentrifugiert und die Zellen in YPD Medium aufgenommen. Das Mating erfolgte bei 30 °C für 6 Stunden, aber anders als beim zuvor beschriebenen Interaktionstest wurden hier 50 µl Zellsuspension der beiden Matingtypen in einem Eppendorfgefäß gemischt und inkubiert. Neben einem direkten Ausplattieren auf die entsprechenden Selektionsmedien und anschließender Inkubation bei 30 °C erfolgte der Interaktionsnachweis hauptsächlich durch replica plating, analog dem oben beschriebenen Interaktionsassay. Zur Analyse von starken Interaktionspartnern (unter Anwendung einer hohen Stringenz) wurden die Kolonien ein weiteres Mal übertragen (replica plating). Die verwendeten Platten (SC, ohne Adenin und Histidin) enthielten 2 mM Methionin, wodurch auf starke Interaktionen der getesteten Proteine getestet wurde. Denn diese Klone zeigten nach einer weiteren Inkubation von bis zu neun Tagen bei 28 °C noch Wachstum (siehe Abschnitt 3.3.2.1 und 3.3.2.3).

Eine positive Interaktion konnte auch, zusätzlich zum Wachstum auf Medium ohne die Aminosäuren Adenin / Histidin, mit Hilfe des X-Gal Assays (siehe 2.23.3) überprüft werden.

2.23.3 X-Gal Assay

Zur Überprüfung von Proteininteraktionen wurde der X-Gal Assay eingesetzt. Nach positiver Proteininteraktion löst der abgespaltene Transkriptionsfaktor PLV die Expression von *lacZ* aus. Dieses Gen kodiert β-Galaktosidase, ein Enzym welche das Substrat X-Gal zu Galaktose

und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol) hydrolysiert. Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird anschließend vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert.

In diese Arbeit wurde die Filtermethode dem Agarose Overlay vorgezogen. Hierfür wurden Nitrocellulosemembranen in Form der verwendeten Petrischalen zugeschnitten, unter sterilen Bedingungen auf die zu untersuchende Selektionsplatten gelegt und nach ungefähr 5 sec vorsichtig abgezogen. Die Membranen, mit den nun anhaftenden Hefekolonien, wurden für 5 – 10 sec in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann wieder für etwa 1 min bei RT aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die Membran anschließend auf ein mit 2 ml frisch hergestellter Z-Puffer / X-Gal Lösung (Z-Puffer, 0,27 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 1,4 mg/ml Endkonzentration X-Gal) getränktes Filterpapier gelegt und in einer geschlossenen Petrischale über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Blaufärbungen wurden mittels Digitalfotographie dokumentiert.

Z-Puffer (pH 7,0)	60 mM Dinatriumhydrogenphosphat × 2H ₂ O
	40 mM Natriumdihydrogenphosphat × H ₂ O
	10 mM Kaliumchlorid
	1 mM Magnesiumsulfat × 7H ₂ O
X-Gal	100 mg/ml in Dimethylformamid

2.23.4 Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion

Die Koloniegröße wird oft als phänotypisches Merkmal eingesetzt, um Mutanten- und Wildtypstämme (Hefe oder Bakterien) zu differenzieren (Fogel und Brunk, 1998).

Die mit Hilfe des mating-based Split-Ubiquitin Systems erhaltenen Interaktionsklone sollten anhand der Interaktionsstärke sortiert werden. Dazu wurden je 3 µl Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von 0,1 auf SC-Medium ohne und mit Methionin (0,15; 2 mM) getropft, diese bei 28 °C über einen Zeitraum von sieben Tagen inkubiert und das Wachstum zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Digitalphotographie dokumentiert. Die resultierenden Koloniegrößen wurden anschließend durch Verwendung des Bildbearbeitungsprogramms Photoshop der Firma Adobe (San Jose, USA) ausgemessen. Um die, durch den Wachstumsunterschied auf 0 mM und methionin-haltigem SC-Medium (0,15 oder 2 mM), identifizierten Interaktionsstärken vergleichen zu können, wurden die Änderungen der Wachstumsraten (%) berechnet. Diese stellen die Differenz der Koloniegrößen normalisiert zur Koloniegröße der Agarplatte ohne Methioninzusatz dar.

3 ERGEBNISSE

3.1 Phospholipase A₂ als ein Interaktionspartner von G α

Wie in der Einleitung erwähnt (Abschnitt 1.1.3) ist in *Eschscholzia californica* mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Phospholipase A₂ als Target von G α charakterisiert worden (Heinze *et al.*, 2007). Dieses Enzym befindet sich in der Plasmamembran in Form eines detergens-resistenten Komplexes mit G α . Allerdings konnte das Enzymprotein bisher nicht isoliert und sequenziert werden.

Es stellte sich die Frage, ob ein Enzym mit ähnlicher Funktionalität und Beziehung zu G α auch in anderen Pflanzen existiert. Diese Frage sollte anhand der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht werden, auch um einen günstigen Ausgangspunkt für die Identifizierung dieses speziellen Signalenzym zu erschließen.

Die Suche nach einer G α -kontrollierten PLA₂ in der Plasmamembran von *Arabidopsis* wurde zunächst auf der Aktivitätsebene durchgeführt. Die PLA₂-Aktivität kann mit Hilfe des fluorogenen Substrats bis-BODIPY FL C₁₁-PC (BPC) nach dem Prinzip des proximity assay gemessen werden. Dieses Substrat enthält fluorogene Substituenten an beiden Fettsäureresten, deren Fluoreszenz sich gegenseitig auslöscht, so dass die Abspaltung einer Fettsäure zum Fluoreszenzanstieg führt.

3.1.1 PLA₂-Aktivität in der Plasmamembran

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, ist eine mit *Eschscholzia* vergleichbare PLA₂-Aktivität in der Plasmamembran von *Arabidopsis* nachweisbar.

Experimente mit Zellkultur von *Eschscholzia californica* hatten gezeigt, dass der dort vorhandene G α / PLA₂-Komplex bei einem pH-Wert von 9,5 dissoziiert und PLA₂ freigesetzt wird (Heinze *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob in *Arabidopsis* ebenfalls ein solcher Komplex mit pH-abhängiger Stabilität vorliegt, wurde zunächst die Aktivität des Enzyms in der Plasmamembran bei pH 7,5 sowie bei pH 9,5 untersucht. Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass die unter pH 9,5 Bedingungen isolierte Plasmamembran eine geringere PLA₂-Aktivität aufweist. Ein weiterer Ansatzpunkt bestand darin, die bei pH 7,5 isolierte Plasmamembran nachträglich zu verändern. So wurde der bestehende pH-Wert von 7,5 durch Inkubation in entsprechendem Puffer auf 9,5 erhöht und die nun vorhandene Aktivität des Enzyms untersucht. Abbildung 11 zeigt einen deutlichen Anstieg der PLA₂-Aktivität nach dieser pH-Erhöhung. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl bei der Aufarbeitung als

auch bei nachträglicher pH-Erhözung ein in der Plasmamembran vorhandener Komplex dissoziiert und lösliche PLA₂ freisetzt.

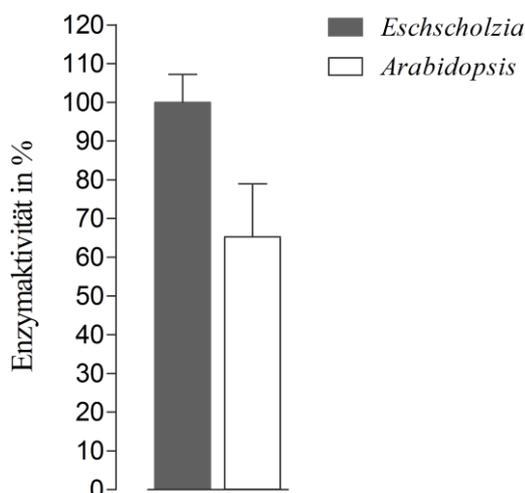


Abb. 10: PLA₂-Aktivität in der Plasmamembran von *Eschscholzia* und *Arabidopsis*

100 µg solubilisierte Plasmamembran (pH 7,5) von *Arabidopsis* (heller Balken) und *Eschscholzia* (dunkler Balken) wurden 5 min nach Substratzugabe (BPC) unter folgenden Bedingungen vermessen: 80 mM BPC, Sensitivität=40, n=2. Der erhaltene Meßwert von *Eschscholzia* wurde als 100 % festgelegt.

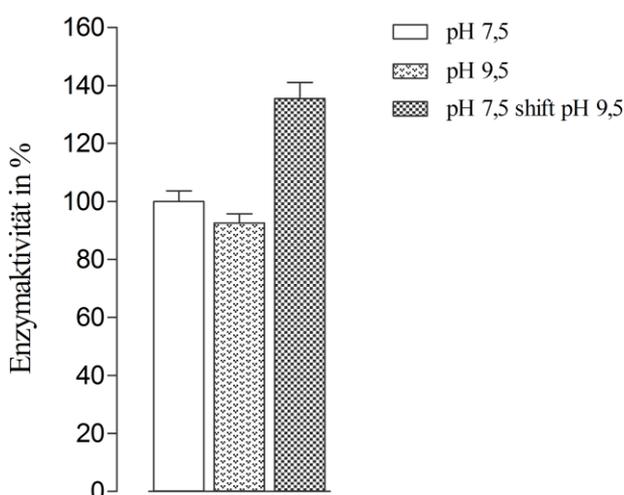


Abb. 11: PLA₂-Aktivität der Plasmamembran von *Arabidopsis* nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten

Es wurde je 2,4 µg solubilisierte Plasmamembran, welche unter verschiedenen pH-Bedingungen isoliert beziehungsweise inkubiert wurden, zur Bestimmung der PLA₂-Aktivität eingesetzt. Die dargestellten Messdaten wurden 10 min nach Substratzugabe (BPC) unter folgenden Bedingungen erhalten: 1 M BPC, Sensitivität=60, n=3. Der erhaltene Meßwert bei pH 7,5 wurde als 100 % festgelegt.

3.1.2 Aktivierung der PLA₂ durch GTP

Die Interaktion von Gα und Phospholipase A₂ kann auch mit Hilfe einer Co-Immünpräzipitation nachgewiesen werden. Es stand ein Antikörper zur Verfügung, welcher das Gα-Protein von *Arabidopsis* (44,5 kDa) in der löslichen (100.000 ×g Überstand), mikrosomalen und der Plasmamembranproteinfraction detektierte. Dieser Antikörper führte auch zur Präzipitation von Gα aus der solubilisierten Plasmamembran. Der immunologische Nachweis ist in Abbildung 12 dargestellt.

Aus Abbildung 13 geht hervor, dass im Co-Immünpräzipitat neben Gα auch die Aktivität von Phospholipase A₂ nachgewiesen werden kann, was für die Interaktion beider Proteine spricht. Dieses gleichzeitige Vorkommen ermöglicht einen funktionellen Test: wenn Phospholipase A₂ ein Zielprotein von Gα ist, sollte sich ihre Aktivität durch klassische Interaktoren des Gα-Proteins, wie GTP und GDP, kontrollieren lassen. Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, dass dies tatsächlich der Fall ist, denn durch Zusatz von GTPγS (stabile Form des GTPs) kann die PLA₂-Aktivität signifikant erhöht werden. Diese Aktivierung spricht für eine direkte Interaktion von Gα und PLA₂ und damit für eine Kontrolle der PLA₂ durch das Gα-Protein. Unklar bleibt allerdings, ob für diese Interaktion weitere, im Co-Immünpräzipitat vorhandene Proteine benötigt werden.

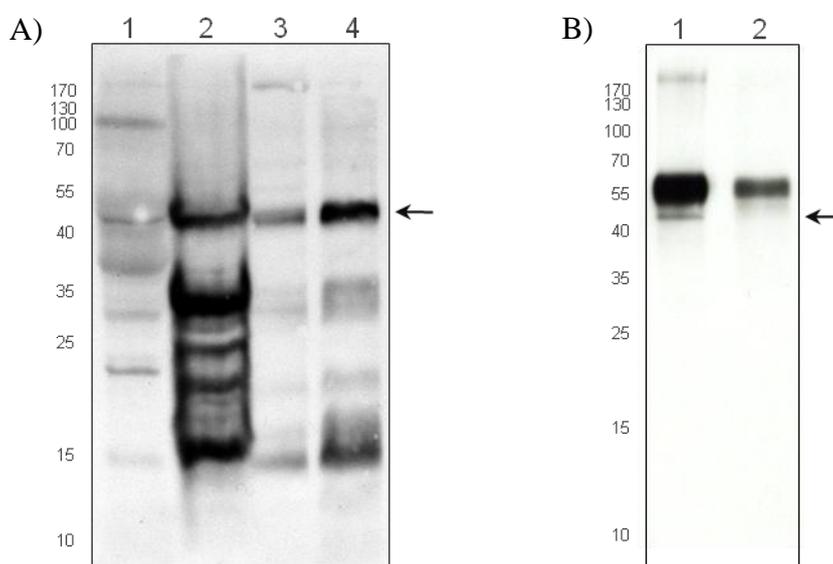


Abb. 12: Immunologischer Nachweis des *Arabidopsis* Gα-Proteins

A) Spur 1 = 60 µg 100.000 ×g Überstand; Spur 2 = 60 µg mikrosomale Proteine; Spur 3 = 15 µg solubilierte Plasmamembranproteine, pH 9,5; Spur 4 = solubilierte Plasmamembranproteine, pH 7,5.

B) Spur 1 = 15 µl Co-Immünpräzipitat (127 µg solubilierte Plasmamembranproteine (pH 7,5) mit 1 µl AK P33 (Verdünnung 1 : 400)); Spur 2 = 15 µl Immunpräzipitat ohne solubilierte Plasmamembranproteine.

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem Gα Antikörper P33 detektiert. Die mittels Pfeil markierten Banden repräsentieren Gα mit einer Größe von 44,5 kDa. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind an der linken Seite in kDa angegeben.

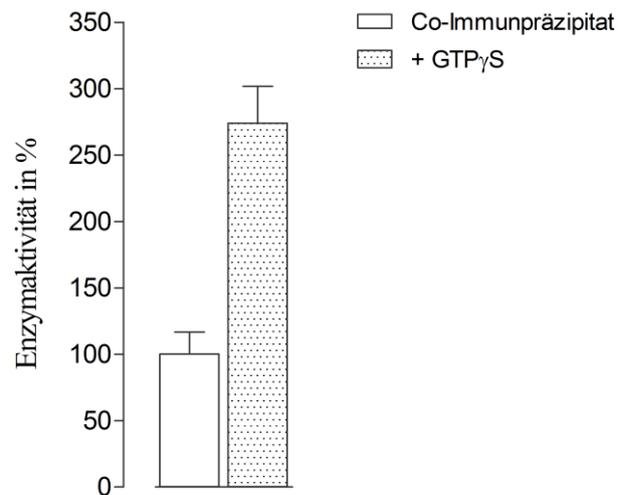


Abb. 13: PLA₂-Aktivität des Co-Immunpräzipitats ist mit GTP γ S stimulierbar

Nach Zugabe von 5 μ M GTP γ S zeigt das Co-Immunpräzipitat (63,6 μ g solubilisierter Plasmamembranproteine (*Arabidopsis*) und 1 μ l α Antikörper P33 (1 : 200)) eine erhöhte PLA₂-Aktivität. 4 min nach Substratzugabe (BPC) wurde unter folgenden Bedingungen gemessen: 1 M BPC, Sensitivität=60, 20 μ l Co-Immunpräzipitat (n=8), 20 μ l Co-Immunpräzipitat plus GTP γ S (n=2). Der erhaltene Meßwert des Co-Immunpräzipitates ohne GTP γ S-Zusatz wurde als 100 % festgelegt.

3.1.3 $G\alpha$ Antikörper beeinflusst PLA_2 -Aktivität

Die Verfügbarkeit eines $G\alpha$ -spezifischen Antikörpers ermöglichte einen weiteren Test der Interaktion von $G\alpha$ und PLA_2 . Es wurde geprüft, inwieweit die Bindung eines Antikörpers an $G\alpha$ dessen Interaktion mit PLA_2 beeinflusst. Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, führt die Zugabe des Antiserums zu einer signifikanten Stimulation der Enzymaktivität. Dies spricht dafür, dass die Interaktion von $G\alpha$ mit dem Antikörper dessen Konformation und damit die Wirkung auf PLA_2 verändert. Dieser Effekt ist bei pH 9,5 nicht nachweisbar, was erneut die Instabilität des $G\alpha / PLA_2$ -Komplexes bei diesem pH-Wert zeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der Plasmamembran von *Arabidopsis* eine mit $G\alpha$ co-präzipitierende Phospholipase A_2 enthalten ist, welche durch $GTP\gamma S$ stimuliert wird. Die Interaktion von $G\alpha$ und PLA_2 lässt sich – in Analogie zur Plasmamembran- PLA_2 von *Eschscholzia* – durch pH-Erhöhung aufheben.

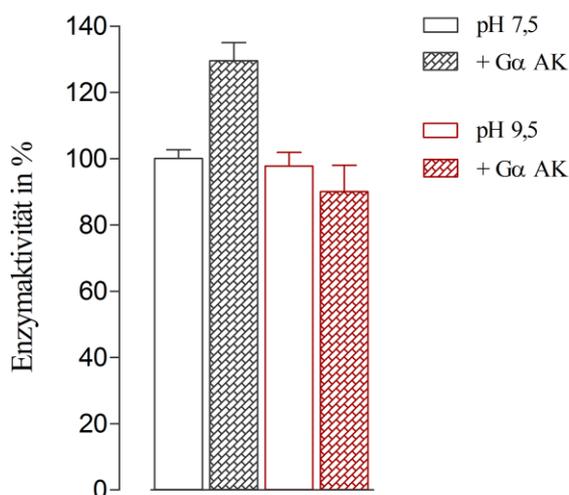


Abb. 14: PLA_2 -Aktivität der Plasmamembran nach Inkubation mit $G\alpha$ Antikörper

2,4 μg solubilisierte Plasmamembranproteine, isoliert bei pH 7,5 oder pH 9,5, wurden mit 1 μl $G\alpha$ Antikörper Tier82 (1 : 250) versetzt und für 30 min unter Schütteln (160 Upm) bei 4°C inkubiert. 10 min nach Substratzugabe (BPC) wurde unter folgenden Bedingungen gemessen: 1 M BPC, Sensitivität=60, n=3. Der erhaltene Meßwert bei pH 7,5 wurde als 100 % festgelegt.

3.2 Identifizierung von G α -Targets mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation

Die erfolgreiche Co-Immunpräzipitation von G α -Protein und PLA₂-Aktivität veranlasste zur Suche nach weiteren Proteinen in demselben Präzipitat. Innerhalb dieser Proteine sind weitere Interaktoren von G α oder zumindest Bestandteile eines größeren G α -beinhaltenden Komplexes zu erwarten. Wie die Abbildung 15 zeigt, präzipitierten tatsächlich eine Vielzahl von Proteinen mit G α . Interessanterweise unterscheiden sich die Co-Immunpräzipitate der bei verschiedenen pH-Werten solubilisierten Plasmamembranen voneinander. Nach Solubilisierung bei pH 7,5 präzipitierten deutlich mehr Proteine mit G α als bei pH 9,5, was erneut daraufhin weist, dass G α bei pH 7,5 jedoch kaum bei pH 9,5 in Form von Komplexen vorliegt. Es stellte sich heraus, dass die Proteinkonzentrationen der erhaltenen Banden für eine massenspektrometrische Identifizierung zu gering waren, weshalb diese angereichert werden mussten. Dazu wurde die Co-Immunpräzipitation mehrfach durchgeführt, die erhaltenen Präzipitate vereinigt und durch Fällung ankonzentriert. Die so deutlich verstärkten Proteinbanden sind ebenfalls in Abbildung 15 (C) dargestellt.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass G α in der Plasmamembran in Komplexform mit anderen Proteinen vorliegt. G α ist jedoch selbst kein integrales Membranprotein, sondern ein peripheres, mit der Membran assoziiertes Protein und kann aus der Membran ausgewaschen werden (Millner, 2001). Deshalb wurde auch die lösliche Proteinfraction auf G α -beinhaltende Komplexe untersucht. Abbildung 16 zeigt zum einen die elektrophoretische Auftrennung der mit G α co-präzipitierenden löslichen Proteine (100.000 \times g Überstand) und zum andern den immunologisch Nachweis des enthaltenen G α -Proteins.

Tabelle 16 enthält die mittels Co-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie identifizierten Bindeproteine von G α . Die Bedeutung dieser potentiellen Interaktoren wird später im Zusammenhang mit weiteren Ergebnissen diskutiert (Abschnitt 3.3.2.3).

Durch die Untersuchung der erhaltenen Co-Immunpräzipitate (Abbildung 15 und 16) wird deutlich, dass sowohl unter den Plasmamembran-gebundenen als auch unter den löslichen Proteinen eine große Zahl an Interaktoren von G α zu erwarten ist. Deren Identifizierung überschreitet sehr wahrscheinlich die Grenzen des sinnvollen Aufwandes innerhalb biochemisch orientierter Methoden, weshalb im Folgenden ein genetisch basiertes Verfahren mit hoher Kapazität genutzt wurde (siehe Abschnitt 3.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch versucht, G α von *Eschscholzia* und *Arabidopsis* zu überproduzieren und zu immobilisieren, um Bindungsstudien mit Plasmamembranproteinen durchzuführen. Auf diese Weise konnten aber bislang keine Proteinbanden erhalten werden,

die massenspektrometrisch auswertbar waren (Daten nicht gezeigt).

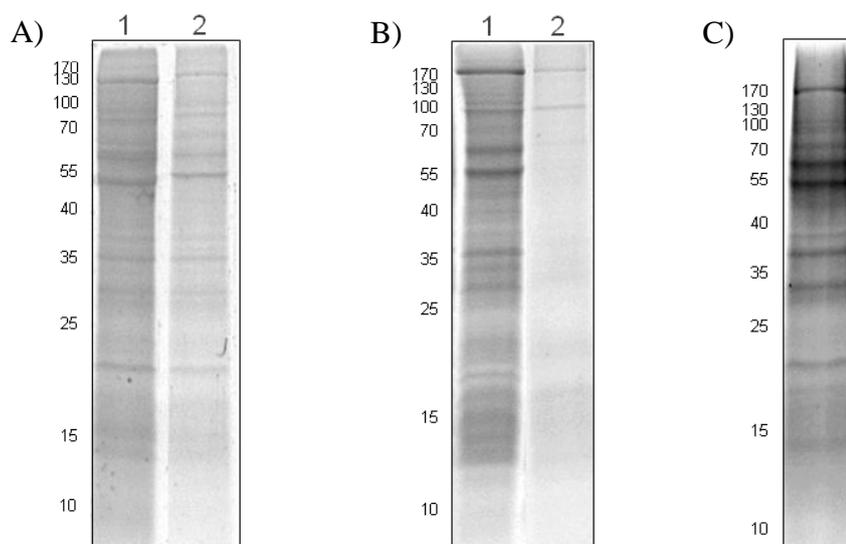


Abb. 15: Proteinfärbung co-präzipitierter Plasmamembranproteine

- A) Spur 1 = 15 µg solubilierte Plasmamembranproteine, pH 7,5; Spur 2 = 25 µl Co-Immünpräzipitation (100 µg Plasmamembran (pH 7,5) + 2 µl Gα Antikörper P33 (1:200)).
 B) Spur 1 = 15 µg solubilierte Plasmamembranproteine, pH 9,5; Spur 2 = 25 µl Co-Immünpräzipitation (100 µg Plasmamembran (pH 9,5) + 6 µl Gα Antikörper P33 (1:200)).
 C) 25 µl Co-Immünpräzipitation (5× (100 µg Plasmamembran (pH 7,5) + 2 µl Gα Antikörper P33 (1:200))).

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine mit SYPRO Ruby angefärbt. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind an der linken Seite in kDa angegeben.

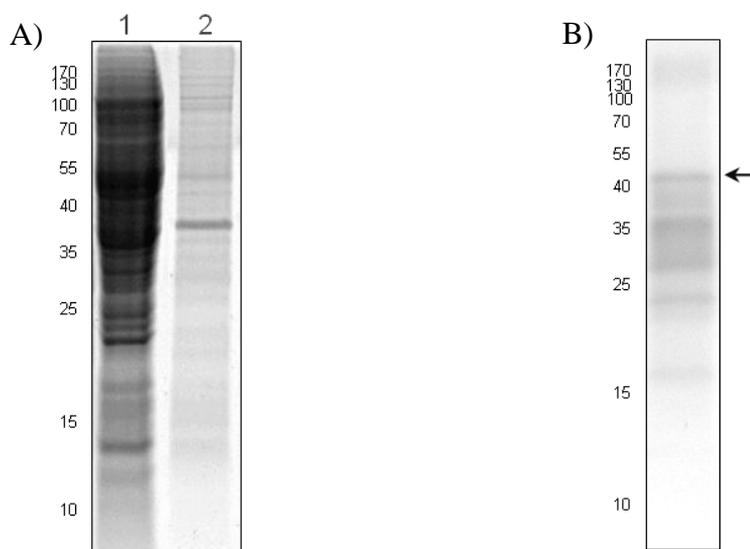


Abb. 16: Proteinfärbung und Immundetektion co-präzipitierter löslicher Proteine

- A) Spur 1 = 60 µg 100.000 ×g Überstand; Spur 2 = 2 µl Gα Antikörper P33 (1:200); Spur 3 = 25 µl Co-Immünpräzipitation (700 µg 100.000×g Überstand + 6 µl Gα Antikörper P33 (1:200)).

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine mit SYPRO Ruby angefärbt.

- B) 25 µl Co-Immünpräzipitation (700 µg 100.000 ×g Überstand + 6 µl Gα Antikörper P33 (1:200)).

Die Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem Gα Antikörper Tier82 detektiert. Die mittels Pfeil markierte Bande repräsentiert Gα mit einer Größe von 44,5 kDa, bei den restlichen Banden könnte es sich um Kreuzreaktionen oder Abbauprodukte von Gα handeln.

Die Molekulargewichte der Markerproteine sind an der linken Seite in kDa angegeben.

Tab. 16: Massenspektrometrisch identifizierte, mit Ga co-präzipitierende Proteine

UniProtKB Accession	Bezeichnung (Annotation)	Masse (kDa)	gefundene Peptide	Sequenzab- deckung (%)	Protein Score
<u>Plasmamembran-Fraktion (pH 7,5)</u>					
* P34788 (At4G09800)	40S ribosomal protein S18	17,5	2	24,3	157
* P22953 (At5G02500)	heat shock cognate 70 kDa protein 1	71,4	8	16,9	115
P92549 (ATMG01190)	ATP synthase subunit α	55	8	37,1	398
P94111 (At1G74020)	strictosidine synthase 1	35,3	5	22,7	166
O82514 (At5G63400)	adenylate kinase 1	26,9	3	18,3	90
Q8LE12 (At4G12420)	outer membrane lipoprotein-like	20,7	3	24,4	139
<u>Fraktion löslicher Proteine</u>					
* Q1NZ06 (At4G24190)	heat shock protein 90.7	94,1	11	17,7	352
P51818 (At5G56010)	heat shock protein 90.3	80	15	30,3	758
Q8GTY0 (At5G60390)	elongation factor 1-alpha	49,5	8	24,5	416
P20363 (At5G19780)	tubulin alpha-5 chain	49,7	4	12,4	180
P53492 (At5G09810)	actin 7	41,7	8	31	399
Q9C5U3 (At5G19990)	26S proteasome AAA-ATPase subunit	47,2	3	10,3	118
* Q9FX54 (At1G13440)	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2	36,9	16	66,9	1426

Angegeben sind die bekannten Informationen der mittels Massenspektrometrie analysierten Protein, die UniProt Datenbanknummer mit dazugehöriger Bezeichnung, die Proteinmasse, die Anzahl der gefundenen Peptide (die gefundenen Peptid-Sequenzen der einzelnen Proteine sind in Anhang V angegeben), die damit verbundenen Sequenzabdeckung und der ermittelte Protein Score. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide einer Proteinbande wurde mit Hilfe der Mascot Software (Matrix Science Inc., USA) analysiert und der Protein Score ist ein Maß dafür, wie gut die zur Analyse eingesetzten Peptide dem Proteine zu geordnet werden konnten. Je höher der Score umso wahrscheinlicher handelt es sich um das angegebene Protein. Ein mit * markierter Interaktorprotein wurden auch mit dem genetisch basierten Verfahren mating-based Split-Ubiquitin System identifiziert (siehe Abschnitt 3.3).

3.3 Identifizierung von $G\alpha$ -Targets mit Hilfe des mating-based Split-Ubiquitin Systems

3.3.1 Überprüfung des Systems auf Funktionalität

Wie in der Einleitung dargelegt (Abschnitt 1.2) kann das mating-based Split-Ubiquitin System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden und seine Eignung zum Nachweis von Bindepartnern pflanzlicher G-Proteine ($G\alpha$) sowie Rezeptoren (GPCR) wurde bereits prinzipiell gezeigt (Pandey und Assmann, 2004; Gookin *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geprüft, ob die zu erwartende Interaktion der $G\alpha$ -Proteine von *Arabidopsis* und *Eschscholzia* mit den Untereinheiten $G\beta$ und $G\gamma$ im Rahmen des heterotrimeren Komplexes nachweisbar ist. Hierfür wurden die $G\alpha$ -Proteine mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert und gegen die G-Protein Untereinheiten als potentielle Interaktoren getestet. Um sicherzustellen, dass nur dann Hefekolonien mit exprimierten Reportergenen entstehen, wenn eine Interaktion der Testproteine stattgefunden hat, wurden in diesen und allen darauffolgenden Experimenten Kontrollen mitgeführt: die Wildtypform des N-terminalen Ubiquitins (NubWt) diene als Positivkontrolle, da es hier auch ohne Interaktion der Testproteine zu positiven readouts (Wachstum ohne Adenin- und Histidin-Zusatz, Blaufärbung nach X-Gal Assay) kommt. Eine weitere Positivkontrolle bestand in einer N-terminalen Fusion der jeweiligen Testproteine mit NubWt. Welche ebenfalls ohne Interaktion der Testproteine zu positiven readouts führt. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass das Fusionsprotein die Interaktion von Nub und Cub behindert. Als Negativkontrolle diene die mutierte Form des N-terminalen Ubiquitins (NubG) (siehe Abschnitt 1.2).

Die Ergebnisse zur Interaktion der G-Protein Untereinheiten sind in Abbildung 17 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die erwartete Interaktion von $G\alpha$ mit $G\beta$ tatsächlich nachweisbar ist. Darüberhinaus kann $G\alpha$ aber auch mit $G\gamma 2$ und mit sich selbst (Dimerbildung) eine Interaktion eingehen. Eine Bildung von $G\alpha$ -Dimeren wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Desweiteren erfolgt die $G\alpha$ -Erkennung spezies-übergreifend: das $G\alpha$ aus *Eschscholzia* bindet die *Arabidopsis* G-Protein Untereinheiten und das $G\alpha$ aus *Arabidopsis* bindet die $G\alpha$ -Untereinheit aus *Eschscholzia*.

Die Interaktion der G-Protein Untereinheiten konnte jedoch nur gezeigt werden, wenn dessen N-Terminus zur Anheftung an die Ubiquitin-Hälfte verwendet wurde. Das heißt eine Fusion mit Nub am C-Terminus der Untereinheiten erbrachte keine Kolonien mit positiven readouts (Daten nicht dargestellt). Dies spricht für die notwendige Ausbildung einer spezifischen

Konformation der G-Protein Untereinheiten, welche bei C-terminaler Fusion der Nub-Hälfte verloren geht. Desweiteren wurde versucht G β und G γ 2 mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins (Cub) zu fusionieren und so eine Interaktion mit G α zu bekräftigen. Dieser Ansatz blieb bis zum Ende dieser Arbeit erfolglos und könnte auf ungenügende beziehungsweise fehlende Expression oder ebenfalls auf eine ungünstige Konformation der Fusionsproteine zurückgeführt werden.

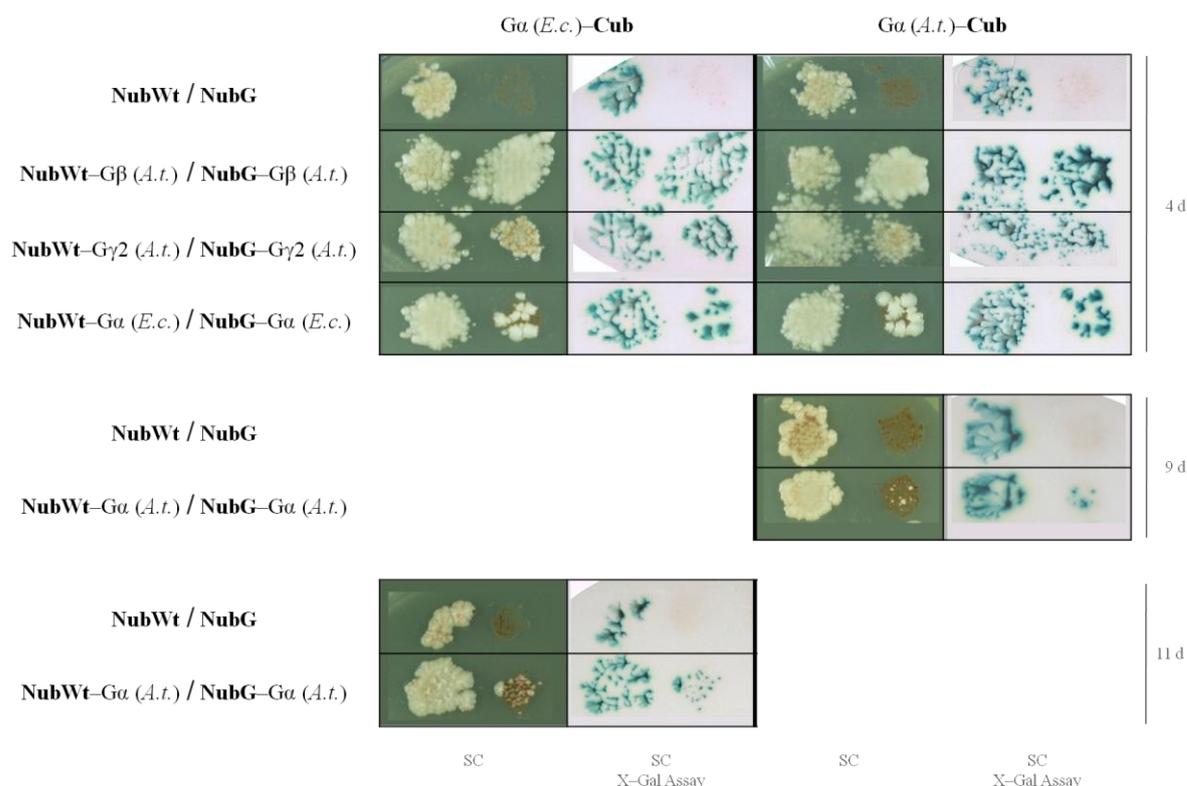


Abb. 17: Interaktion von G α und den Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins

Durch sexuelle Vermehrung der haploiden Hefestämme THY.AP4 (beinhaltet G α -Cub-PLV) und THY.AP5 (beinhaltet Nub fusioniert mit der cDNA eines links außen bezeichneten Gens) erhaltene diploide Hefekolonien wuchsen bei 30 °C auf Selektionsmedium (SC) (linke Spalte, grüner Hintergrund). Die Dauer der Inkubation ist rechts außen angegeben. Anschließend wurden die Kolonien auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, woran sich ein X-Gal Assay anschloss (rechte Spalte, heller Hintergrund). Die paarweise angeordneten Kolonien zeigen jeweils links die Fusion mit NubWt (Positivkontrolle) und rechts mit NubG. Als weitere Kontrollen wurden Plasmide mit NubWt und NubG ohne Testproteine eingesetzt (erste Zeile jedes Experiments).

3.3.2 Suche nach Bindungspartnern von $G\alpha$ in cDNA-Expressionsbanken von *Arabidopsis* und *Eschscholzia*

Nach dem erfolgreichen Test auf Funktionalität (Abschnitt 3.3.1) schloss sich das Durchsuchen der cDNA-Expressionsbanken an, um Gene zu identifizieren, welche Bindepartner von $G\alpha$ kodieren. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede in der Interaktionsfähigkeit des $G\alpha$ -Proteins aus *Eschscholzia* oder *Arabidopsis* erkennbar wurden, erfolgte eine Suche innerhalb der *Arabidopsis*-Proteine zunächst mit $G\alpha$ aus *Eschscholzia*. Abbildung 18 zeigt ein typisches Ergebnis. Insgesamt sind schätzungsweise 900 positive Klone (Interaktionen) erzeugt worden, was auf eine enorme Zahl von potentiellen Interaktoren des $G\alpha$ -Proteins hinweist.

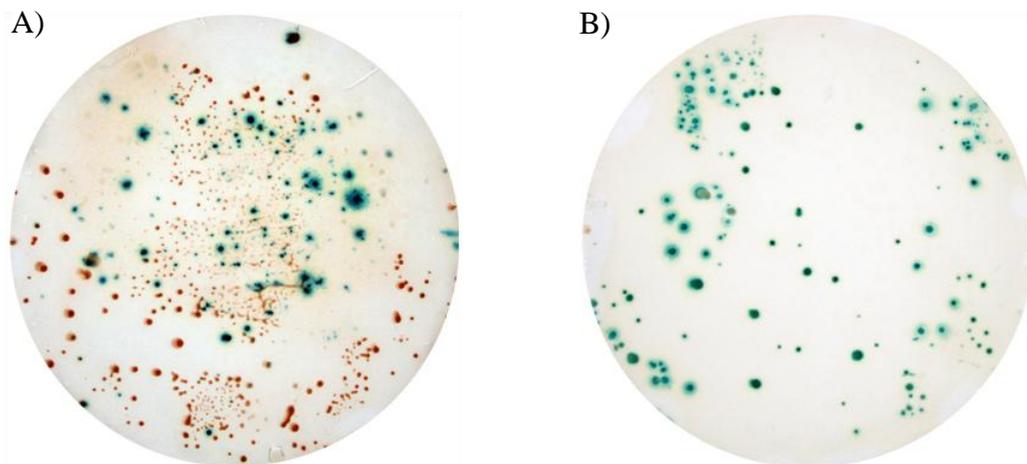


Abb. 18: Suche nach Bindungspartnern von $G\alpha$ (*Eschscholzia*) innerhalb der *Arabidopsis*-Proteine

Die durch sexuelle Vermehrung der haploiden Hefestämme THY.AP4 (beinhaltet $G\alpha$ (*E.c.*)-Cub-PLV) und THY.AP5 (beinhaltet NubG fusioniert mit den ORF's der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank) und Wachstum auf Selektionsmedium bei 30 °C erhaltenen diploiden Hefekolonien wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und ein X-Gal Assay durchgeführt.

A) 8 d Wachstum auf SC-Medium mit Adenin und Histidin.

Möglichkeit der Rot/Weiß Analyse, da beide Hefestämme Mutanten der Adeninbiosynthese (*ade2*) sind und Wachstum auf Adenin-haltigem Medium zur Akkumulation eines roten Pigmentes führt (= rote Hefezellen) (Ugolini und Bruschi, 1996). Hefezellen, welche aufgrund einer erfolgreichen Interaktion der Testproteine das Reportergen *ade2* exprimieren, wachsen weiß und sind nach durchgeführtem X-Gal Assay blaugefärbt.

B) 13 d Wachstum auf SC-Medium.

Es wachsen nur Hefezellen mit erfolgter Interaktion der Testproteine und der daraus resultierenden Expression der Reportergene (*ade2*, *his3*, und *lacZ*). Nach X-Gal Assay zeigen diese eine blaue Färbung.

3.3.2.1 Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion

Die große Zahl zu erwartender Interaktoren von $G\alpha$ macht eine Auswahl beziehungsweise Wertung der Qualität der Interaktionen erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher erstmals der Versuch unternommen, die interagierenden Proteine nach der Interaktionsstärke zu sortieren. Zunächst wurden aus den oben genannten 900 Klonen mit potentiellen Interaktorproteinen 62 zufällig ausgewählt, subkultiviert, die Plasmide isoliert und mit Hilfe von plasmidspezifischen Primern die enthaltene cDNA sequenziert. Nach Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit der Datenbank WU-BLAST2 (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp>) und Eliminierung von mehrfach aufgetretenen Sequenzen (Interaktorproteinen) konnten 38 individuelle $G\alpha$ -bindenden Proteine anhand ihrer cDNA ermittelt werden.

Dem Fusionsprotein $G\alpha$ -Cub-PLV ist ein durch Methionin (Met) reprimierbarer Promotor vorgeschaltet, so dass die exprimierte Proteinmenge durch Met-Zusatz nach unten reguliert werden kann. Daraus sollten Änderungen im Wachstum resultieren, das heißt bei geringer Expression von $G\alpha$ müssten Proteine mit hoher Bindungsaffinität zu $G\alpha$ gegenüber jenen mit geringer Affinität bevorzugt interagieren und somit den Transkriptionsfaktor freisetzen. Die Wachstumsrate auf Met-haltigem Medium stellt damit ein Maß für die Stärke der Interaktion des jeweiligen Testproteins mit $G\alpha$ dar. Die ermittelten 38 Hefekolonien wurden deshalb erneut subkultiviert und auf Platten mit dem üblichen Nährmedium plus unterschiedliche Methioninkonzentrationen aufgetropft. Zur Gewährleistung gleicher Ausgangs-Zellzahlen erfolgte eine Angleichung der optischen Dichten. Das Wachstum der Kolonien wurde über sieben Tagen mittels einer Digitalkamera dokumentiert und die Koloniegrößen durch digitale Bildanalyse ermittelt. Ein typisches Ergebnis ist Abbildung 19 zusammengefasst.

In Abbildung 20 sind die Veränderungen der Koloniegrößen beim Wachstum auf Methioninkonzentration von 0,15 mM und 2 mM dargestellt, bezogen auf die analogen Kolonien ohne Methioninzusatz. Sie repräsentieren die unterschiedlichen Wachstumsraten und damit sehr wahrscheinlich auch die unterschiedliche Interaktionsstärke der $G\alpha$ -bindenden Proteine. Als Anhaltspunkt für die Interaktionsstärke der Ubiquitinhälften wurde der diploide Klon von $G\alpha$ (*E.c.*)-Cub-PLV und NubWt mitgeführt, denn hier ist die Reassemblierung des Ubiquitins nicht durch ein Testprotein erzwungen oder beeinflusst (in Abschnitt 3.3.1 als Positivkontrolle erwähnt). Zusätzlich wurden noch weitere Interaktionen aus Abschnitt 3.3.1 mitgeführt, um eine Aussage über die Bindungsstärke von $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma 2$ treffen zu können. Es lässt sich eindeutig feststellen, dass die Wachstumsrate der meisten diploiden Hefezellen

auf 2 mM Met Agarplatten stark abnimmt und dadurch negative Werte auf der Y-Achse erzeugt werden. Das bedeutet, dass diese Interaktionen auf einen höheren Gehalt an $G\alpha$ -Cub-PLV angewiesen und damit schwächer sind. Zu dieser Gruppe zählen auch die Interaktionen von NubWt und $G\gamma 2$ mit $G\alpha$. Nur wenige der untersuchten Interaktionen finden auch bei einem limitierten Gehalt an $G\alpha$ -Cub-PLV noch statt und zählen somit zu den stärkeren Interaktoren von $G\alpha$. Darunter befinden sich erwartungsgemäß $G\beta$, aber auch $G\alpha$. Bei der Dimerisierung von $G\alpha$ handelt es sich also sehr wahrscheinlich, um eine starke Interaktion. Die 38 $G\alpha$ (*E.c.*) bindenden *Arabidopsis*-Proteine sind in Tabelle 17 genannt und nach absteigender Bindungsstärke geordnet.

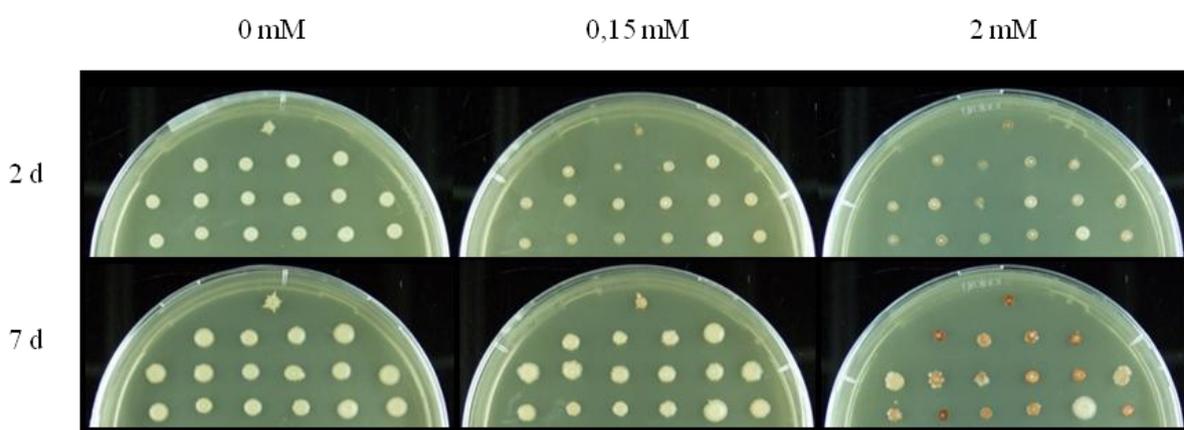
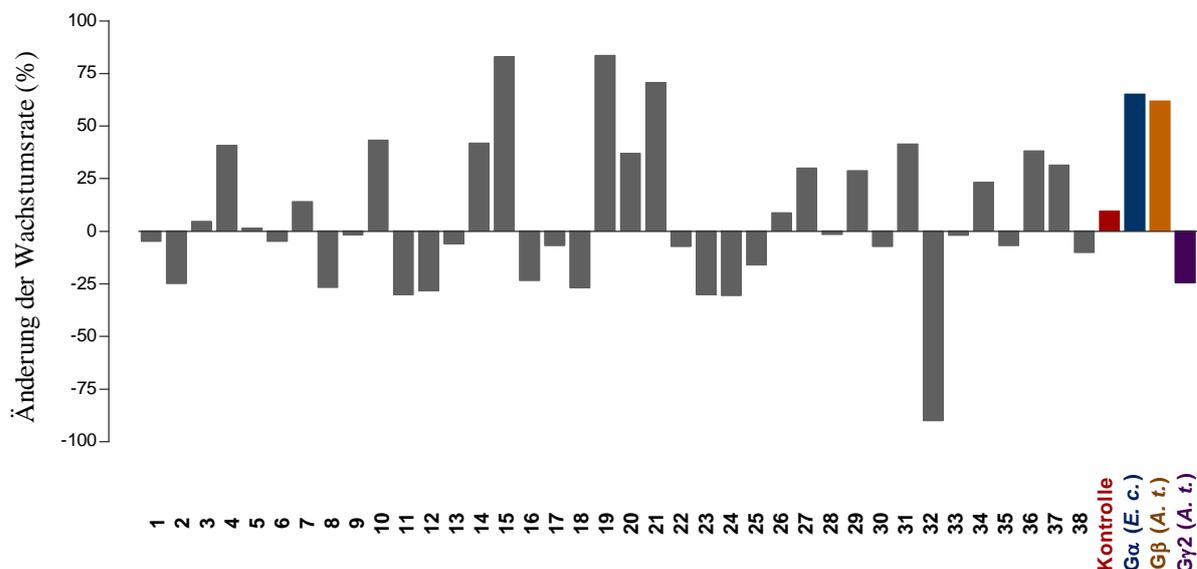


Abb. 19: Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion von $G\alpha$ (*Eschscholzia*)-Bindepartnern innerhalb der *Arabidopsis*-Proteine

Diploide Hefekolonien wurden in Flüssigmedium (SC) angezogen, auf $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und jeweils $3 \mu\text{l}$ auf SC-Agarplatten, welche kein Met, 0,15 mM Met oder 2 mM Met enthielten, aufgetropft. Nach einem Inkubationszeitraum von zwei beziehungsweise sieben Tagen bei 30°C wurden die Platten fotografiert und die Größen der Kolonien mittels Bildanalyse festgestellt. Eine Rotfärbung der Kolonien weist auf das Absterben der Hefezellen hin.

0,15 mM Methionin



2 mM Methionin

Abb. 20: Änderung der Wachstumsrate von Kolonien, welche mit *Gα (Eschscholzia)* interagierende Proteine exprimieren

Die Nummern 1 – 38 repräsentieren Kolonien, welche die cDNA eines interagierenden Proteins (*Arabidopsis*) beinhalten und in Tabelle 17 benannt werden. Diese Kolonien wurden in Flüssigkultur (SC) angezogen, auf $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und jeweils 3 μ l auf SC-Agarplatten, welche kein Met, 0,15 mM Met oder 2 mM Met enthielten, aufgetropft. Nach einer Inkubation für sieben Tage bei 30 °C wurden die Platten fotografiert und die Koloniegroßen mittels Bildanalyse ermittelt. Die Daten stellen Veränderungen der Koloniegroßen in % dar, normalisiert zur Koloniegroße der Met-freien Agarplatte. Die farbigen Säulen stehen für Kolonien, die bei der Überprüfung des Systems auf Funktionalität (3.3.1, Abb. 17) erhalten und einem identischen Wachstumstest unterzogen wurden: es handelt sich dabei um NubG-Fusionen mit *Gα (E.c.)*, *Gβ (A.t.)* und *Gγ2 (A.t.)*. Als Kontrolle (roter Balken) dient die Interaktion von *Gα (E.c.)*-Cub mit NubWt, welche nicht durch Testproteine beeinflusst wird, wie im Text erklärt.

Tab. 17: Mit *Ga* (*Eschscholzia*) interagierende *Arabidopsis*-Proteine, nach absteigender Bindungsstärke sortiert

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz)
34	At5G44340	beta tubulin-4	444 (177 – 429)
19 ^{2*}	At1G08110	glyoxalase I	235 (48 – 235)
15 ^{2*}	At1G51200	zinc finger (AN1-like) family protein	173 (67 – 173)
37	At4G21105	cytochrome-c oxidase	68 (1 – 68)
36	At3G55440	triosephosphate isomerase	254 (26 – 254)
21*	At2G41630	transcription factor TFIIB	312 (81– 312)
31	At4G27960	ubiquitin conjugating enzyme	178 (71 – 178)
38	At1G72120	transporter (TGF-beta receptor domain)	1095 (1 – 280)
27	At1G48440	unknown protein	129 (1 – 129)
30*	At3G10850	glyoxalase II	258 (1 – 258)
35	At3G09690	hydrolase	527 (1 – 322)
20 ^{5*}	At1G24267	unknown protein	344 (213 – 344)
10	At3G08030	unknown protein	365 (1 – 305)
29	At1G08360	60S ribosomal protein L10A	216 (205 – 216)
17*	At4G02600	MLO 1 (seven-transmembrane domain)	526 (450 – 526)
5	At3G14990	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein	392 (1 – 182)
14	At4G34100	protein binding / zinc ion binding	1108 (923 – 1108)
6 ^{2*}	At5G43570	PR (pathogenesis-related) peptide	91 (1 – 61)
7 ^{2*}	At1G62180	adenosine 5'-phosphosulfate reductase	454 (283 – 454)
22 ^{4*}	At2G20280	zinc finger (CCCH-type) family protein	371 (316 – 371)
33	At5G02500	heat shock cognate 70 kDa protein 1	651 (554 – 651)
3 ^{3*}	At1G16470	20S proteasome subunit PAB1	235 (4 – 235)
28 ^{2*}	At4G26110	nucleosome assembly protein 1	372 (1 – 278)
11 ^{4*}	At3G13520	arabinogalactan protein 12	60 (1 – 60)
2*	At3G62290	ADP-ribosylation factor A1E	181 (19 – 181)
9 ^{2*}	At4G24580	Rho GTPase-activating protein	902 (503 – 744)
16*	At1G22840	cytochrome C	114 (1 – 144)
26	At4G23850	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	666 (446 – 666)
13	At3G51550	receptor-like kinase	895 (772 – 895)
1	At3G15357	unknown protein	143 (4 – 143)
4 ^{2*}	At1G22300	14-3-3 ε	254 (1 – 254)
8 ^{4*}	At5G42980	thioredoxin 3	118 (1 – 118)
12	At5G62690	beta tubulin-2 / -3	450 (276 – 450)
18 ^{2*}	At1G72480	unknown protein	509 (468 – 509)
23	At1G66410	calmodulin 4	149 (60 – 149)
24	At4G15545	unknown protein	337 (263 – 337)

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz)
25	At3G53390	transducin family protein	558 (416 – 558)
32*	At3G52590	ubiquitin extension protein	128 (1 – 128)

Hochgestellte Zahlen zeigen, wie oft ein Interaktionsklon gefunden wurde. Ein mit * markierter Klon zeigte nach einem erneutem mbSUS Experiment (Abschnitt 3.3.2.2) eine Interaktion sowohl mit $G\alpha$ aus *Eschscholzia* als auch mit $G\alpha$ aus *Arabidopsis*. Die aufgeführten Bezeichnungen (Annotationen) wurden der TAIR-Datenbank entnommen. Die Identitäten der $G\alpha$ -bindenden Proteine wurden aus der sequenzierten cDNA des gefundenen Klons (NubG-Fusion) ermittelt. In einigen Fällen wurde das gesamte Protein gefunden, in Anderen erhebliche Teilsequenzen, mindestens jedoch 120 Basenpaare (40 AS).

3.3.2.2 Validierungen der bisherigen Ergebnisse

Die bisher vorgestellten Ergebnisse beruhen auf einer Zufallsauswahl von diploiden Hefekolonien, welche infolge der $G\alpha$ -Protein-Interaktion entstanden. Im Zuge der Validierung dieser Ergebnisse wurde geprüft, ob eine cDNA-Expressionsbank als Lieferant potentieller $G\alpha$ -Interaktorgene (Fusionen mit NubG) verwendet werden kann. Dadurch würde sich das Spektrum an potentiellen Interaktionsproteinen wesentlich erweitern.

Der NubG-cDNA Vektor einiger ausgewählter diploider Hefeklone wurde isoliert, erneut in den Hefestamm THY.AP5 transformiert und auf eine Interaktion mit $G\alpha$ getestet. Hierbei wurde aber nicht nur das $G\alpha$ aus *Eschscholzia*, sondern auch das *Arabidopsis*- $G\alpha$ als „bait“-Protein verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Daraus geht hervor, dass alle getesteten Vektoren wiederholt eine Interaktion zeigten und zwar mit den $G\alpha$ -Proteinen beider Pflanzen.

Um sicherzustellen, dass die in Tabelle 17 aufgeführten Interaktoren als vollständige Proteine exprimiert wurden und auch so mit $G\alpha$ interagierten, erfolgte die Klonierung ausgewählter Volllänge-cDNAs aus *Arabidopsis* (erhalten vom SSP Consortium, über TAIR) in Nub-Vektoren und der anschließende Test auf Interaktion mit $G\alpha$. Dabei wurde die Interaktion folgender Proteine bestätigt (Abbildung 22): arabinogalactan protein 12 (At3G13520), ADP-ribosylation factor A1E (At3G62290), thioredoxin 3 (At5G42980) und 14-3-3 ϵ (At1G22300). Für weitere Volllänge-cDNAs, wie MLO 1, transducin family protein, glyoxalase I, β tubulin-4 und zinc finger (AN1-like) family protein blieb die Klonierung bis zum Abschluss dieser Arbeit erfolglos. Es fällt auf, dass es sich dabei meist um große Gene / Proteine handelt (MLO 1 hat 526 AS), was auf erschwerte Bedingungen bei der Hefe-Transformation (siehe Abschnitt 2.23.1) hinweisen könnte.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das mating-based

Split-Ubiquitin System in der Lage ist, $G\alpha$ -bindende Proteine mit ausreichender Zuverlässigkeit zu identifizieren, und dass die gefundenen Interaktionen tatsächlich biologisch relevante Bindeproteine darstellen.

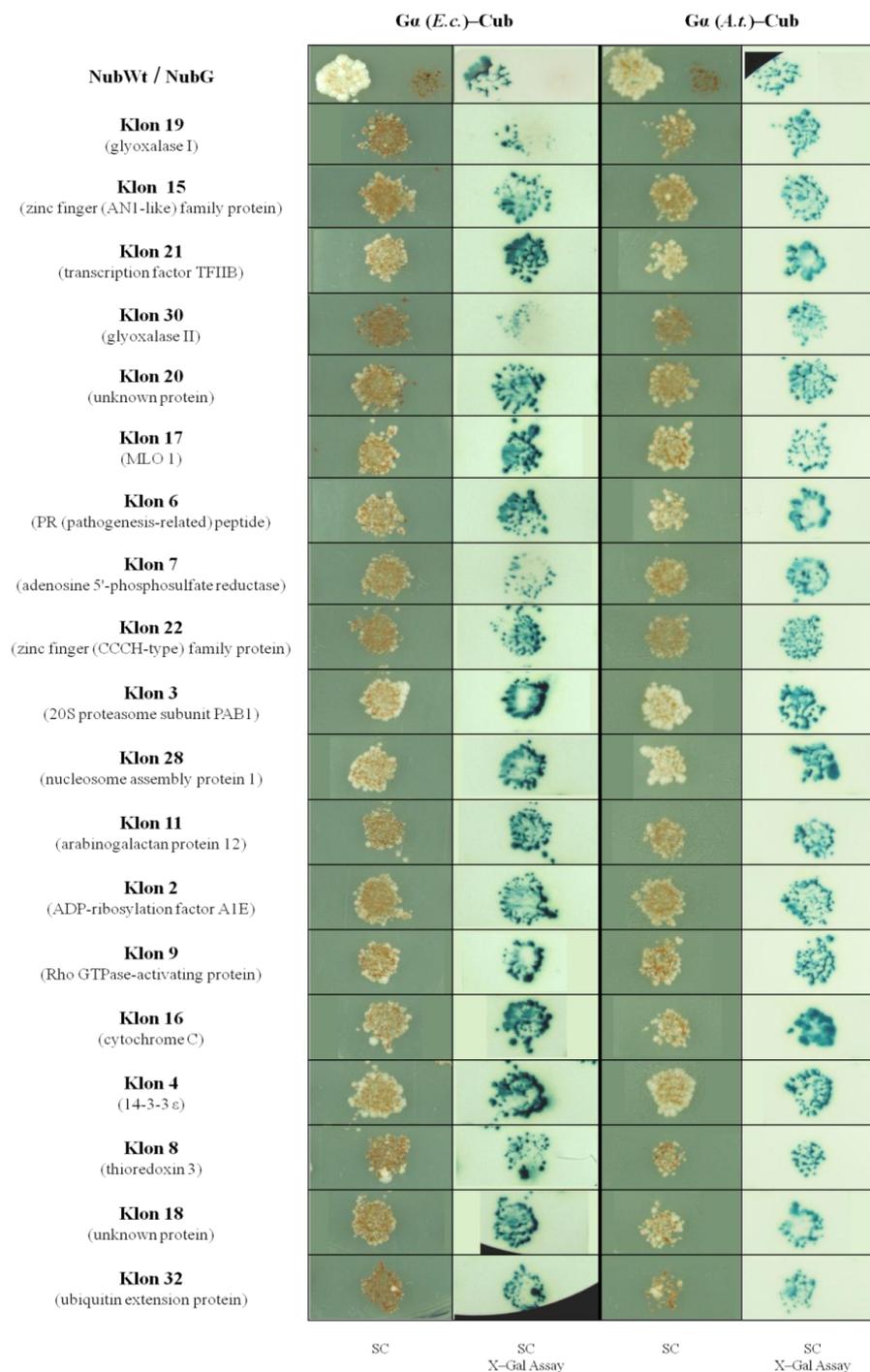


Abb. 21: Interaktoren aus der cDNA-Expressionsbank (*Arabidopsis*) wurden erneut auf Interaktion mit $G\alpha$ getestet

Durch sexuelle Vermehrung der haploiden Hefestämme THY.AP4 (beinhaltet $G\alpha$ -Cub-PLV) und THY.AP5 (beinhaltet NubG fusioniert mit einem ORF aus der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank) erhaltene diploide Hefekolonien wuchsen 7 d auf Selektionsmedium (SC) bei 30 °C (linke Spalte, grüner Hintergrund). Anschließend wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, woran sich ein X-Gal Assay anschloss (rechte Spalte, heller Hintergrund). Als Kontrollen wurden Plasmide mit NubWt und NubG ohne Testproteine eingesetzt (erste Zeile).

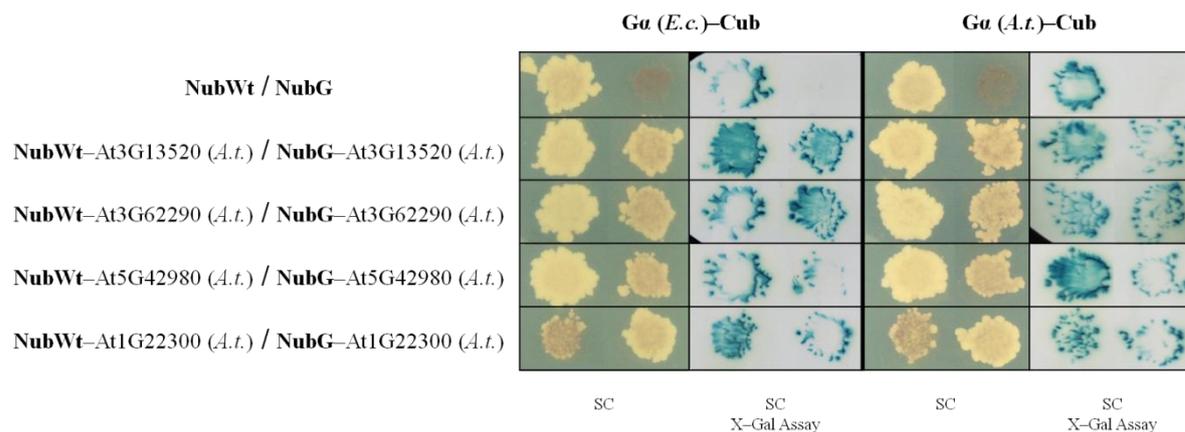


Abb. 22: Volllänge-cDNAs der Interaktoren aus der cDNA-Expressionsbank (*Arabidopsis*) wurden erneut auf Interaktion mit *Gα* getestet

Durch sexuelle Vermehrung der haploiden Hefestämme THY.AP4 (beinhaltet *Gα-Cub-PLV*) und THY.AP5 (beinhaltet Nub fusioniert mit der cDNA eines ausgewählten *Arabidopsis*-Gens) erhaltene diploide Hefekolonien wuchsen 7 d auf Selektionsmedium (SC) bei 30 °C (linke Spalte, grüner Hintergrund). Anschließend wurden die Kolonien auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, woran sich ein X-Gal Assay anschloss (rechte Spalte, heller Hintergrund). Die paarweise angeordneten Kolonien zeigen jeweils links die Fusion mit NubWt (Positivkontrolle) und rechts mit NubG. Als weitere Kontrollen wurden Plasmide mit NubWt und NubG ohne Testproteine eingesetzt (erste Zeile).

3.3.2.3 Erhöhungen der Stringenz der *Gα*-Protein-Interaktion

Wie aus dem Wachstumstest zur Bestimmung der Interaktionsstärke (Abschnitt 3.3.2.1) hervorgeht, kann durch Reduktion der verfügbaren *Gα*-Menge auf starke Bindungspartner selektiert werden. Um das Maß der Verringerung von *Gα* durch die Repression des Methionin-kontrollierten Promotors (pMet25) abzuschätzen, wurden Kulturen des Hefestamms THY.AP4 mit unterschiedlichen Methioninkonzentrationen im Medium angezogen und die resultierende Menge des Fusionsproteins *Gα-Cub-PLV* mittels eines VP16 Antikörpers bestimmt (Abbildung 23). *Gα* wurde dabei „stellvertretend“ durch das *Gα*-beinhaltende Fusionsprotein bestimmt. Es wurde auch versucht, den Gehalt an *Gα* direkt zu ermitteln, wobei sich aber die Affinität der zur Verfügung stehenden *Gα*-selektiven Antikörper als zu gering erwiesen.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen, wurde der Versuch unternommen, die unter stringenten Bedingungen auffindbaren Interaktoren der *Gα*-Proteine aus *Eschscholzia* und *Arabidopsis* zu identifizieren und zu vergleichen. Dafür wurden zunächst die cDNA-Expressionsbanken beider Pflanzen mit dem *Gα* der gleichen Spezies getestet, anschließend erfolgte die Suche nach Interaktoren in der cDNA-Expressionsbank von *Arabidopsis* mit dem *Gα* aus *Eschscholzia*. Der Versuchsablauf war identisch mit dem in Abschnitt 3.3.2 dargelegten Durchsuchen der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank mit *Gα* aus *Eschscholzia*,

enthielt aber einen zusätzlichen Selektionsschritt: nach Wachstum auf SC-Medium (7 d) wurden die erhaltenen Kolonien auf gleiches Medium plus 2 mM Methionin übertragen. Der überwiegende Teil der Kolonien reagierte darauf mit einem Wachstumsstopp bis hin zum Absterben der Hefezellen. Somit wurden die Kolonien auf jene reduziert, die nach Verminderung des $G\alpha$ -Gehaltes (7 d Wachstum auf 2 mM Methionin) noch eine deutliche Interaktion zeigten, um dadurch eine ausreichende Menge an Transkriptionsfaktor PLV für das Wachstum und die Induktion von β -Galactosidase freizusetzen. Jeder Versuchsansatz wurde in fünf Parallelen durchgeführt und für alle auf diese Weise ermittelten Interaktionsklone erfolgte eine Subkultivierung in Methionin-haltigem (2 mM) SC-Flüssigmedium, Isolierung ihre Plasmide und die Sequenzierung der enthaltene cDNA mit Hilfe eines plasmidspezifischen Primers. Die Identifizierung der Sequenzen aus *Arabidopsis* erfolgte mit Hilfe der Datenbank WU-BLAST2 (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp>). Gene von $G\alpha$ -bindenden Proteinen, die in der cDNA-Expressionsbank von *Eschscholzia* gefunden wurden, konnten meist nicht direkt identifiziert werden, da die Sequenzierung des *Eschscholzia*-Genoms nicht abgeschlossen ist und die vorhandenen ESTs aus Blütenknospen oder Zellkultur (Floral Genom Projekt der Ohio State University, Carlson *et al.*, 2006) kaum gefundene Interaktoren enthalten. Deshalb wurden die Sequenzen aus *Eschscholzia* zur Suche innerhalb der *Arabidopsis*-Datenbank (TAIR) benutzt, um Homologe der *Eschscholzia*-Proteine aufzufinden. Das Ausmaß der Sequenzübereinstimmungen zeigte dabei eine breite Streuung. Nach der Eliminierung mehrfach aufgetretener Klone desselben Interaktors konnte folgende Anzahl von $G\alpha$ -bindenden Proteine anhand ihrer cDNA-Sequenz ermittelt werden:

Suche mit $G\alpha$ (*E.c.*) in der cDNA von *Arabidopsis* = 53,

Suche mit $G\alpha$ (*A.t.*) in der cDNA von *Arabidopsis* = 48,

Suche mit $G\alpha$ (*E.c.*) in der cDNA von *Eschscholzia* = 33.

Der letztgenannte Versuchsansatz enthielt vier weitere cDNA-Sequenzen, denen kein bekanntes Protein zugeordnet werden konnten (diese kodieren vermutlich unbekannte *Eschscholzia*-Proteine).

Anhand der erhaltenen Daten wurde für jeden Versuchsansatz das Maß der Vollständigkeit des Screenings abgeschätzt. Der Ansatzpunkt dafür ist die Überlegung, dass bei einer vollständigen Abdeckung alle Interaktoren wiederholt auftreten müssten. Aus der Zahl der Mehrfach-Funde, bezogen auf die Anzahl der insgesamt aufgetretenen und sequenzierten Klone kann dann die Vollständigkeit in Prozent abgeschätzt werden (Daten siehe Anhang VI). Die bei den Versuchsansätzen ermittelte Vollständigkeit der Expressionsbanksuche ist in Abbildung 24 dargestellt. Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass fünf unab-

hängige Paarungsexperimente nicht ausreichend waren, um alle Proteine zu identifizieren, die mit Ga unter Anwendung einer hohen Stringenz interagieren können. Es wurden je ein Drittel der Interaktoren der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank und etwa 14 % der *Eschscholzia* cDNA-Expressionsbank erfasst. Es kann also von einer sehr großen Zahl, potentiell mit Ga interagierender Proteine ausgegangen werden und die eingangs gefundenen 900 Interaktionsklone repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit interaktionsfähige Proteine.

Die Quantifizierung der Interaktion der aus den cDNA-Expressionsbanken stammenden Genprodukte erfolgte erneut durch Wachstumsfähigkeit, analog dem bereits im Abschnitt 3.3.2.1 vorgestellten Wachstumstest. Abweichend vom Versuchsablauf erfolgte hier die Subkultivierung der diploiden Hefezellen in Methionin-haltigem (2 mM) SC-Flüssigmedium. Ein typisches Ergebnis ist in Abbildung 25 zusammengefasst.

Alle in der cDNA-Expressionsbank-Suche identifizierten und potenziell mit Ga interagierenden Proteine sind in den Tabellen 18 – 20 aufgelistet und nach absteigender Bindungsstärke (Wachstumsdifferenz in $\text{mm}^2 / 7\text{d}$) geordnet. Leider waren einige der aufgetretenen und sequenzierten Klone nicht zum Wachstum in submerser Kultur in der Lage und somit von der Bestimmung und dem Ordnen nach Interaktionsstärke ausgeschlossen. Diese ebenfalls mit Ga interagierenden Proteine sind in der Tabelle 21 aufgeführt. Der Grund für das fehlende submerse Wachstum ist nicht zwangsläufig in einer zu geringen Bindung an Ga (bei 2 mM Met) zu vermuten, wodurch eine unzureichende Menge an Transkriptionsfaktor PLV für das Wachstum in Submerskultur entstehen würde. Vielmehr könnte es an einem zu großen Zeitraum zwischen dem Paarungsexperiment und dem Wachstumstest liegen, da Hefezellen nur eine geringe Überlebensdauer auf Platten zeigen. Dafür spricht, dass unmittelbar nach den Paarungsexperimenten eine submerse Anzucht zur Plasmidisolierung und cDNA-Sequenzierung möglich war. Abbildung 26 zeigt die durch Methionin verursachten Änderungen der Wachstumsrate für den größten Teil der Interaktoren von Ga, die in der cDNA-Expressionsbank-Suche gefundenen wurden.

Unter allen durch das mating-based Split-Ubiquitin System und Anwendung hoher Stringenz (2 mM Methionin) identifizierten Bindeproteinen interagierten 16 (~ 13 %) sowohl mit Ga aus *Eschscholzia* als auch mit Ga aus *Arabidopsis* (Tabelle 22). Die ersten 13 Proteine wurden beim „heterologen“ Versuchsansatz gefunden, das heißt die *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank wurde einmal mit Ga aus *Eschscholzia* und ein weiteres Mal mit Ga aus *Arabidopsis* durchsucht. Darunter befindet sich auch die zu erwartende Interaktion mit G β , welche bei beiden untersuchten Ga-Proteinen zu den Stärksten zählten (siehe Abbildung 26). Die letzten drei in Tabelle 22 aufgeführten Proteine wurden dagegen beim „homologen“

Versuchsansatz gefunden, bei welchen innerhalb der Proteine der eigenen Spezies gesucht wurde. Die Auffindung von G β unter den Interaktoren beider G α -Proteine spricht einerseits für die prinzipielle Richtigkeit der mittels des angewandten Systems erhaltenen Daten und zeigt andererseits ein gewisses Maß an überlappender Spezifität der G α -Proteine distanter Pflanzen. Die Sequenzübereinstimmung beider G α -Proteine beträgt 83 %, woraus sich aber veränderte Bindestellen für potentielle Targets ergeben könnten. Die Sequenzunterschiede der G α -Proteine verschiedener Pflanzen sind zwar gering, konzentrieren sich aber im N-terminalen Bereich (siehe Anhang I). Die wenigen übereinstimmenden Bindepartner sollte daher nicht überraschen, allerdings sind wegen der unvollständigen Abdeckung der Suche innerhalb der cDNA-Expressionsbanken sicher noch nicht alle starken Interaktoren gefunden worden.

Einen Überblick über mögliche Funktionen aller nach Anwendung des mating-based Split-Ubiquitin Systems ermittelten G α -Interaktionspartner liefert Abbildung 27. Dabei steht die Idee im Vordergrund aufzudecken, um was für Proteine es sich handelt und welchen Funktionskategorien sie zugeordnet werden können. Die Fülle an Informationen wurde auf diese Weise zusammenfassend dargestellt. Auch in *Arabidopsis* ist nicht die Funktion und Wirkungsweise aller Proteine bekannt, weshalb kein Anspruch auf Vollständigkeit gestellt wird. Für 24 % konnten keine Informationen zur Funktion in den Datenbanken gefunden werden. Der Großteil (18 %) aller Interaktoren kann zu Proteinen, die an der Antwort auf Pathogene, Verletzung, Kälte, Hitze, Cadmium oder andere Umweltreize beteiligt sind gezählt werden, was bei einem Signalprotein durchaus zu erwarten ist. Signaltransduktions- und Phosphorylierungsschritten können etwa 7 % zugeordnet werden. Etwas überraschend ist der Anteil von 11 % an der Transkription beteiligter Proteine und Transkriptionsfaktoren sowie von circa 10 % in Translationsprozesse involvierte Proteine. Dies eröffnet die Möglichkeit einer durch G-Proteine vermittelten Regulation der Genexpression auf Transkriptions- und gegebenenfalls auch auf Translationsebene.

Von besonderer Bedeutung war die Suche nach Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen des genetisch basierten Screens (mbSUS) und den durch Co-Immunpräzipitation gefundenen Proteinen. Trotz der auffälligen Unvollständigkeit des Screens konnten einige der in der Plasmamembran von *Arabidopsis* identifizierten Bindepartner (Abschnitt 3.2) bestätigt werden. Dazu zählen glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2, heat shock protein 90.7, 40S ribosomal protein S18 und heat shock cognate 70 kDa protein 1, welche bei der Suche mit G α von *Eschscholzia* innerhalb der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank identifiziert wurden, letzteres hingegen ohne den Einsatz von Methionin.

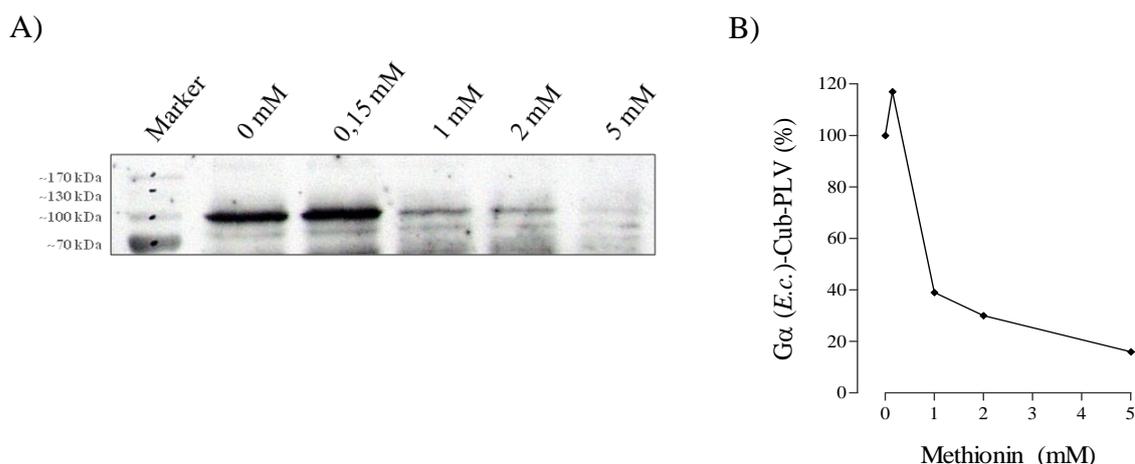


Abb. 23: Methionin-Zusatz reduziert die Konzentration an verfügbarem Gα-Protein

Der Hefestamm THY.AP4, welcher die Expressionskassette Gα (E.c.)-Cub-PLV beinhaltet, wurde in Flüssigmedium mit verschiedenen Methioninkonzentrationen (0 mM; 0,15 mM; 1 mM; 2 mM und 5 mM) bei 30 °C für 3 – 4 d kultiviert.

A) Western Blot mit VP16 Antikörper.

10⁷ Zellen jeder Hefekultur wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem VP16 Antikörper, der gegen eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors PLV gerichtet ist, detektiert. Die erhaltene 95,4 kDa Bande des Fusionsproteins repräsentiert Gα. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind an der linken Seite in kDa angegeben.

B) Darstellung des Gehaltes an Gα (E.c.)-Cub-PLV in %.

Die erhaltenen Banden des Fusionsproteins (siehe Western Blot, A) wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop vermessen und 0 mM Methionin als 100% festgelegt.

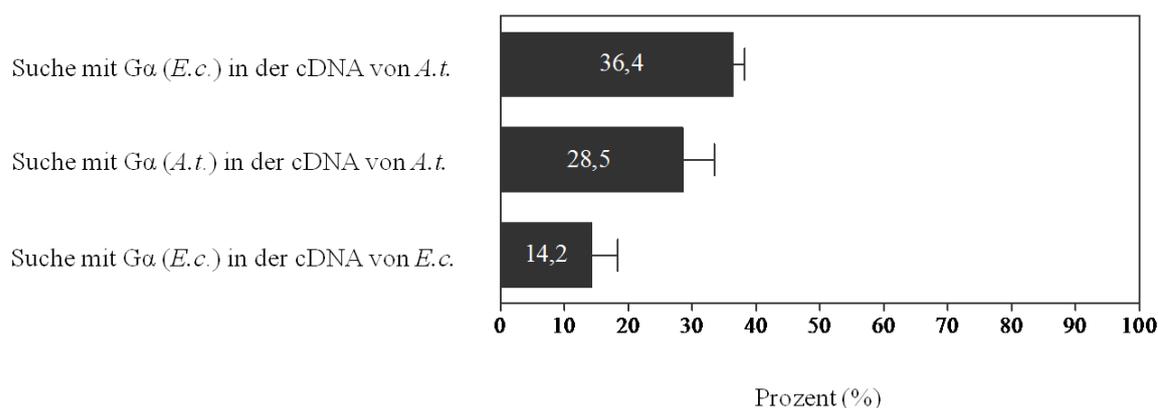


Abb. 24: Abschätzung zur Vollständigkeit der Erfassung aller möglichen Gα-Bindepartner in den cDNA-Expressionsbanken

Jeder Ansatz zur Suche in den cDNA-Expressionsbanken wurde fünfmal durchgeführt (n = 5), von allen erhaltenen Klonen die cDNA sequenziert und mit Informationen / Sequenzen aus Proteindatenbanken abgeglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte der mehrfach aufgetretenen Interaktoren in %, bezogen auf die gesamte Anzahl der Klone (100%) (Daten siehe Anhang VI).

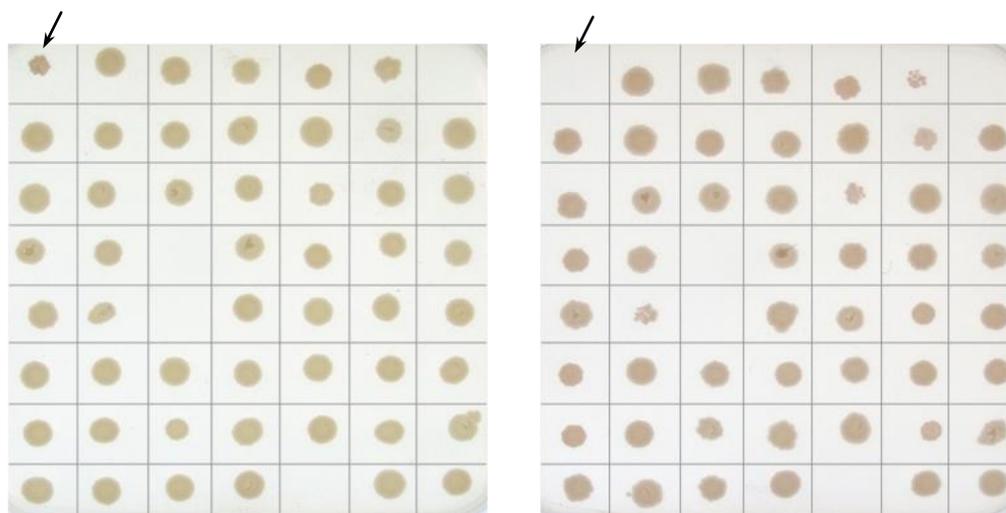


Abb. 25: Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion bei hoher Stringenz gefundener *Ga* (*Eschscholzia*)–Bindungspartner innerhalb der *Arabidopsis*–Proteine

Diploide Hefekolonien wurden in Flüssigmedium (SC + 2 mM Met) angezogen, auf die identische optische Dichte ($OD_{600} = 0,1$) eingestellt und jeweils 3 μ l auf SC–Agarplatten, welche kein Met (linke Platte) oder 2 mM Met (rechte Platte) enthielten, aufgetropft. Nach einer Inkubation von sieben Tagen bei 30 °C wurden die Kolonien dokumentiert und die Größen der Kolonien mittels Bildanalyse ermittelt. Die Pfeile kennzeichnen denselben Interaktionsklon bei verschiedenen Methioninkonzentrationen.

Tab. 18: Mit *Ga* (*Eschscholzia*) interagierende *Arabidopsis*–Proteine

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA–Sequenz)	Wachstumsdifferenz in $mm^2 / 7d$
8	At2G47380	cytochrome c oxidase subunit Vc	64 (1 – 64)	1,87
19 ²	At1G25275	unknown protein	85 (1 – 85)	1,86
44 ³	At2G25080	glutathione peroxidase 1	236 (81 – 231)	1,66
17	At1G79920	unknown protein (ATP binding)	831 (725 – 831)	1,62
2 ⁵	At3G62270	anion exchange family protein	703 (526 – 703)	1,44
16 ²	At1G13440	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2	338 (1 – 301)	1,26
26	At4G34460	AGB1	377 (359 – 377)	1,14
46	At3G28940	avirulence-responsive protein	169 (1 – 169)	1,06
50 ²	At1G17490	unknown protein	77 (1 – 77)	1,05
31	At5G16130	40S ribosomal protein S7	190 (177 – 187)	0,97
28	At1G76180	dehydrin (ERD14)	185 (1 – 71)	0,67
45	At4G27090	60S ribosomal protein L14	134 (5 – 134)	0,41
25 ²	At3G02220	unknown protein	227 (92 – 227)	0,41
43 ²	At1G30880	unknown protein	120 (1 – 120)	0,35
15	At5G67490	unknown protein	108 (5 – 61)	0,30
1	At1G07590	pentatricopeptide repeat(PPR)-containing protein	534 (1 – 33)	0,30

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz)	Wachstumsdifferenz in mm ² / 7d
20 ³	At1G51200	zinc finger (AN1-like) family protein	173 (1 – 173)	0,27
36	At4G24190	HSP90-like protein	823 (377 – 647)	0,21
3 ²	At1G56340	calreticulin 1	426 (386 – 426)	0,21
11	At2G02390	glutathione s-transferase 18	228 (1 – 228)	0,20
22 ²	At4G17330	unknown protein (RNA binding)	2037 (1934 – 2023)	0,17
52	At5G10695	unknown protein	67 (1 – 67)	-0,01
55	At4G24270	histone H3	136 (98 – 115)	-0,12
49	At5G20830	sucrose synthase 1	808 (735 – 808)	-0,26
10 ²	At5G19550	aspartate aminotransferase 2	405 (1 – 323)	-0,30
9	At4G28970	transposable element gene	196 (157 – 196)	-0,32
27	At2G33150	3-ketoacyl-CoA thiolase	465 (321 – 343)	-0,40
24 ²	At3G13460	ECT2	664 (623 – 664)	-0,36
34	At5G52200	unknown protein	191 (1 – 142)	-0,43
40	At3G48930	embryo defective 1080	160 (4 – 160)	-0,65
4	At3G49530	NTL6	469 (323 – 469)	-0,67
38 ²	At3G12490	phytoalexin 6	234 (28 – 199)	-0,70
41	At4G26430	COP9 signalosome subunit 6B	317 (1 – 294)	-0,81
32	At5G20720	chaperonin 20	253 (1 – 199)	-0,87
14	At1G43170	ribosomal protein 1	389 (173 – 389)	-0,91
54	At3G08610	unknown protein	65 (1 – 65)	-1,04
37 ⁴	At1G26630	translation initiation factor 5A-2	159 (1 – 159)	-1,06
21	At5G63150	unknown protein	138 (35 – 138)	-1,14
12	At5G11960	unknown protein	334 (19 – 298)	-1,26
48	At3G47836	unknown protein	64 (1 – 64)	-1,27
7	At1G66200	glutamine synthetase	356 (332 – 356)	-1,48
13	At4G09800	40S ribosomal protein S18C	152 (1 – 152)	-1,78
29 ²	At3G09390	metallothionein	81 (7 – 81)	-1,87
42	At5G14030	translocon-associated protein	195 (62 – 195)	-1,95
18 ²	At4G14600	unknown protein	137 (1 – 137)	-1,96
35	At1G24510	T-complex protein 1 ε subunit	535 (179 – 427)	-1,98
33	At5G40810	cytochrome C1	307 (23 – 307)	-2,02
47	At5G10200	unknown protein	631 (592 – 631)	-2,65
5	At5G53750	unknown protein	408 (1 – 304)	-3,86

Hochgestellte Zahlen zeigen, wie oft ein Interaktionsklon gefunden wurde. Schwarz umrahmte Interaktionsklone wurden auch beim Paarungsexperiment *Gα (A.t.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)* gefunden. Blau umrahmte ebenfalls, konnten dort aber keinem Wachstumstest unterzogen werden. Grau hinterlegt sind Proteine mit einer positiven Wachstumsdifferenz, die zu den stärksten Bindepartnern gezählt werden.

Tab. 19: Mit Ga (*Arabidopsis*) interagierende *Arabidopsis*-Proteine

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz)	Wachstumsdifferenz in mm ² / 7d
15	At3G18420	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	316 (100 – 316)	1,59
48 ²	At4G14320	60S ribosomal protein L36a/L44	105 (1 – 105)	1,52
40	At1G71730	unknown protein	177 (97 – 177)	1,52
42 ²	At4G34460	AGB1	377 (359 – 377)	1,11
39	At5G19510	elongation factor 1B α -subunit 2	224 (136 – 224)	1,09
11	At3G52590	ubiquitin extension protein	128 (1 – 128)	0,85
32	At5G47210	nuclear RNA-binding protein	305 (260 – 305)	0,76
22	At4G08950	exordium (EXO)	314 (252 – 280)	0,62
1 ³	At4G14960	alpha tubulin-6 chain	450 (320 – 430)	0,58
25	At3G52200	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	637 (431 – 673)	0,56
47	At1G09100	26s proteasome AAA-ATPase	423 (134 – 423)	0,50
3	At4G02640	basic leucine zipper (AtBZIP10)	417 (377 – 411)	0,47
38 ²	At1G69720	heme oxygenase 3	285 (70 – 285)	0,45
43 ²	At1G77440	20S proteasome beta subunit	204 (1 – 204)	0,42
4	At5G48640	cyclin family protein	253 (1 – 145)	0,41
27	At2G21270	ubiquitin fusion degradation family protein	340 (159 – 340)	0,30
31	At1G07590	pentatricopeptide repeat(PPR)-containing protein	534 (1 – 295)	0,28
10	At2G33150	3-ketoacyl-CoA thiolase	465 (322 – 343)	0,19
14	At1G71410	protein kinase family protein	909 (777 – 909)	0,18
45	At2G14900	gibberellin-regulated family protein	108 (27 – 108)	0,14
37	At1G62740	stress-inducible protein	571 (250 – 553)	0,12
5	At5G11970	unknown protein	105 (8 – 105)	0,09
30	At1G56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	156 (1 – 91)	-0,12
44 ²	At3G16640	translationally controlled tumor protein	168 (1 – 168)	-0,28
29	At3G16420	jacalin-related lectin 30	298 (1 – 297)	-0,60
2	At5G12410	THUMP domain-containing protein	376 (1 – 177)	-0,60
33	At5G27700	structural constituent of ribosome	82 (1 – 82)	-0,74
28 ²	At3G03380	DegP protease	1097 (1079 – 1097)	-0,78
46	At1G76180	dehydrin (ERD14)	185 (1 – 71)	-1,67

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz)	Wachstumsdifferenz in mm ² / 7d
49	At4G14430	delta3, delta2-enoyl CoA isomerase	240 (1 – 240)	-1,81
35	At1G17490	unknown protein	77 (1 – 71)	-2,30
8 ³	At5G20290	40S ribosomal protein S8	222 (118 – 222)	-2,35
6	At1G54080	oligouridylate-binding protein 1A	426 (281 – 426)	-2,37
36 ²	At1G50200	alanyl-tRNA synthetase	1003 (730 – 1003)	-2,85

Hochgestellte Zahlen zeigen, wie oft ein Interaktionsklon gefunden wurde. Schwarz umrahmte Interaktionsklone wurden auch beim Paarungsexperiment *Ga* (*E.c.*)–Cub + NubG–cDNA (*A.t.*) gefunden. Rot umrahmte ebenfalls, konnten dort aber keinem Wachstumstest unterzogen werden. Grün umrahmte Interaktionsklone wurden auch beim Paarungsexperiment *Ga* (*E.c.*)–Cub + NubG–cDNA (*E.c.*) gefunden. Grau hinterlegt sind Proteine mit einer positiven Wachstumsdifferenz, die zu den stärksten Bindepartnern gezählt werden.

Tab. 20: Mit *Ga* (*Eschscholzia*) interagierende *Eschscholzia*–Proteine

Klon	EST	homologes <i>Arabidopsis</i> –Protein	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz / Übereinstimmung)	Wachstumsdifferenz in mm ² / 7d
37 ³	338161	At3G46940 (dUTP pyrophosphatase family)	166 (4 – 156 / 75%)	1,59
10	/	At5G24313 (unknown protein)	81 (49 – 67 / 63%)	1,48
6	/	At3G20810 (transcription factor jumonji)	429 (176 – 355 / 57%)	1,35
25	337678	At3G43810 (calmodulin 7)	149 (1 – 149 / 93%)	1,16
9	/	At5G37630 (embryo defective 2656)	1051 (865 – 1025 / 46%)	0,98
39	339832	At2G23090 (unknown protein)	78 (1 – 78 / 85%)	0,91
11	/	At4G35160 (O-methyltransferase family 2)	382 (33 – 298 / 33%)	0,76
38	/	/		0,75
23	338060	At5G64130 (unknown protein)	115 (9 – 98 / 64%)	0,74
31	/	At5G63670 (SPT4 homolog 2)	116 (3 – 115 / 79%)	0,63
12	/	At5G41400 (zinc finger family protein)	176 (34 – 72 / 51%)	0,63
22	/	At1G22770 (gigantea)	1173 (875 – 1166 / 66%)	0,57
32	/	At4G11880 (agamous-like 14)	221 (1 – 56 / 92%)	0,43
7	/	At2G09990 (40S ribosomal protein S16)	146 (132 – 146 / 90%)	0,25
28	/	At3G25716 (unknown protein)	64 (2 – 37 / 32%)	0,16
26	337494	At1G09200 (histone H3)	136 (119 – 136 / 87%)	-0,12
17	/	At3G22850 (unknown protein)	248 (171 – 247 / 69%)	-0,20
24	339486	At4G02930 (elongation factor Tu, putative)	454 (264 – 309 / 85%)	-0,33
29	337142	At3G13580 (60S ribosomal protein L7)	244 (200 – 244 / 84%)	-0,42
27	/	At1G13370 (histone H3, putative)	136 (57 – 122 / 39%)	-0,46

Klon	EST	homologes <i>Arabidopsis</i> -Protein	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz / Übereinstimmung)	Wachstums- differenz in mm ² / 7d
8	/	At5G60600 (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase)	741 (213 – 274 / 77%)	-0,53
13	/	/		-0,57
20	/	At3G07950 (rhomboid protein-related)	304 (183 – 287 / 63%)	-0,58
36	340441	At5G27700 (structural constituent of ribosome)	82 (69 – 81 / 85%)	-0,60
21	337680	At4G00660 (DEAD/DEAH box helicase, putative)	505 (97 – 122 / 79%)	-0,63
5	340941	At5G24400 (6-phosphogluconolactonase)	325 (168 – 249 / 67%)	-0,80
16	338660	At3G12050 (Aha1 domain-containing protein)	360 (167 – 296 / 56%)	-1,08
19	338403	At5G58420 (40S ribosomal S4 protein)	262 (147 – 184 / 79%)	-1,19
30	/	At2G03938 (unknown protein)	49 (9 – 36 / 46%)	-1,20
3	/	At4G26840 (small ubiquitin-like modifier 1)	100 (83 – 95 / 87%)	-1,74
18	/	At2G43870 (polygalacturonase / pectinase, putative)	384 (150 – 303 / 49%)	-2,01
15	338483	At3G04920 (40S ribosomal protein S24)	133 (109 – 123 / 88%)	-2,11
35	/	At1G02090 (COP9 signalosome subunit 7)	260 (3 – 244 / 71%)	-2,28
2	/	/		-3,76
33 ²	339461	At3G16640 (translationally-controlled tumor protein)	168 (100 – 168 / 59%)	-4,96

Mit den erhaltenen *Eschscholzia*-cDNAs wurde innerhalb der *Arabidopsis*-Proteindatenbank nach Homologen gesucht. Hochgestellte Zahlen zeigen, wie oft ein Interaktionsklon gefunden wurde. Grün umrahmte Interaktionsklone wurden auch beim Paarungsexperiment *Ga (A.t.)-Cub* + *NubG-cDNA (A.t.)* gefunden. Grau hinterlegt sind Proteine mit einer positiven Wachstumsdifferenz, die zu den stärksten Bindepartnern gezählt werden.

Tab. 21: Mit $G\alpha$ interagierende Proteine, deren Bindungsstärke nicht quantifizierbar war

Klon	AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Aminosäuren (sequenzierte DNA-Sequenz)
<u><i>Gα (E.c.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)</i></u>			
6	At5G19510	elongation factor 1B α -subunit 2	224 (140 – 224)
23	At5G10450	14-3-3 λ	248 (5 – 248)
30	At1G02770	unknown protein	316 (1 – 287)
53	At5G20290	40S ribosomal protein S8	222 (116 – 210)
<u><i>Gα (A.t.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)</i></u>			
7	At3G24550	proline extensine-like receptor kinase 1	652 (626 – 652)
9	At3G12490	phytolectin 6	234 (159 – 234)
12	At1G22840	cytochrome C	114 (1 – 114)
13	At4G34100	protein binding / zinc ion binding	1108 (239 – 1108)
16	At1G79920	unknown protein (ATP binding)	831 (727 – 831)
17 ²	At2G25080	glutathione peroxidase 1	236 (81 – 236)
18	At3G13460	ETC2	285 (70 – 285)
19 ³	At3G02220	unknown protein	227 (92 – 227)
20	At5G22800	embryo defective 1030	978 (865 – 978)
21	At3G12580	HSP70	650 (499 – 623)
23	At4G16450	unknown protein	106 (1 – 66)
24 ²	At5G10450	14-3-3 λ	248 (5 – 144)
34	At3G52930	fructose-bisphosphate aldolase	358 (1 – 315)
41	At4G13110	BSD domain-containing protein	316 (206 – 316)
<u><i>Gα (E.c.)–Cub + NubG–cDNA (E.c.)</i></u>			
4	/		
34	At1G56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	427 (16 – 319 / 63%)

Hochgestellte Zahlen zeigen, wie oft ein Interaktionsklon gefunden wurde. Rot umrahmte Interaktionsklone wurden auch beim Paarungsexperiment *Gα (A.t.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)* gefunden und konnten dort dem Wachstumstest unterzogen werden. Blau umrahmte Interaktionsklone wurden auch beim Paarungsexperiment *Gα (E.c.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)* gefunden und konnten dort dem Wachstumstest unterzogen werden. Der grün umrahmte Interaktionsklon konnte auch beim Paarungsexperiment *Gα (A.t.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)* gefunden werden. Der gelb umrahmte Interaktionsklon wurde beim Paarungsexperimente *Gα (E.c.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)* als auch *Gα (A.t.)–Cub + NubG–cDNA (A.t.)* gefunden und konnte keinem Wachstumstest unterzogen werden.

Tab. 22: Proteine, die sowohl *Gα* von *Eschscholzia* als auch von *Arabidopsis* binden

AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)
At4G34460	AGB1
At1G07590	pentatricopeptide repeat(PPR)-containing protein
At2G33150	3-ketoacyl-CoA thiolase
At1G76180	dehydrin (ERD14)
At1G17490	unknown protein
At2G25080	glutathione peroxidase 1
At1G79920	unknown protein (ATP binding)
At3G12490	phytocystatin 6
At3G13460	ETC2
At3G02220	unknown protein
At5G10450	14-3-3 λ
At5G19510	elongation factor 1B α-subunit 2
At5G20290	40S ribosomal protein S8
At1G56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
At3G16640	translationally controlled tumor protein
At5G27700	structural constituent of ribosome

Schwarz geschriebene Proteine wurden von *Gα* (*E.c.*) sowie von *Gα* (*A.t.*) innerhalb der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank gebunden (= „heterologer“ Versuchsansatz). Grau geschrieben Proteine wurden von *Gα* (*E.c.*) innerhalb der *Eschscholzia* cDNA-Expressionsbank ebenso wie von *Gα* (*A.t.*) innerhalb der *Arabidopsis* cDNA-Expressionsbank gebunden (= „homologer“ Versuchsansatz).

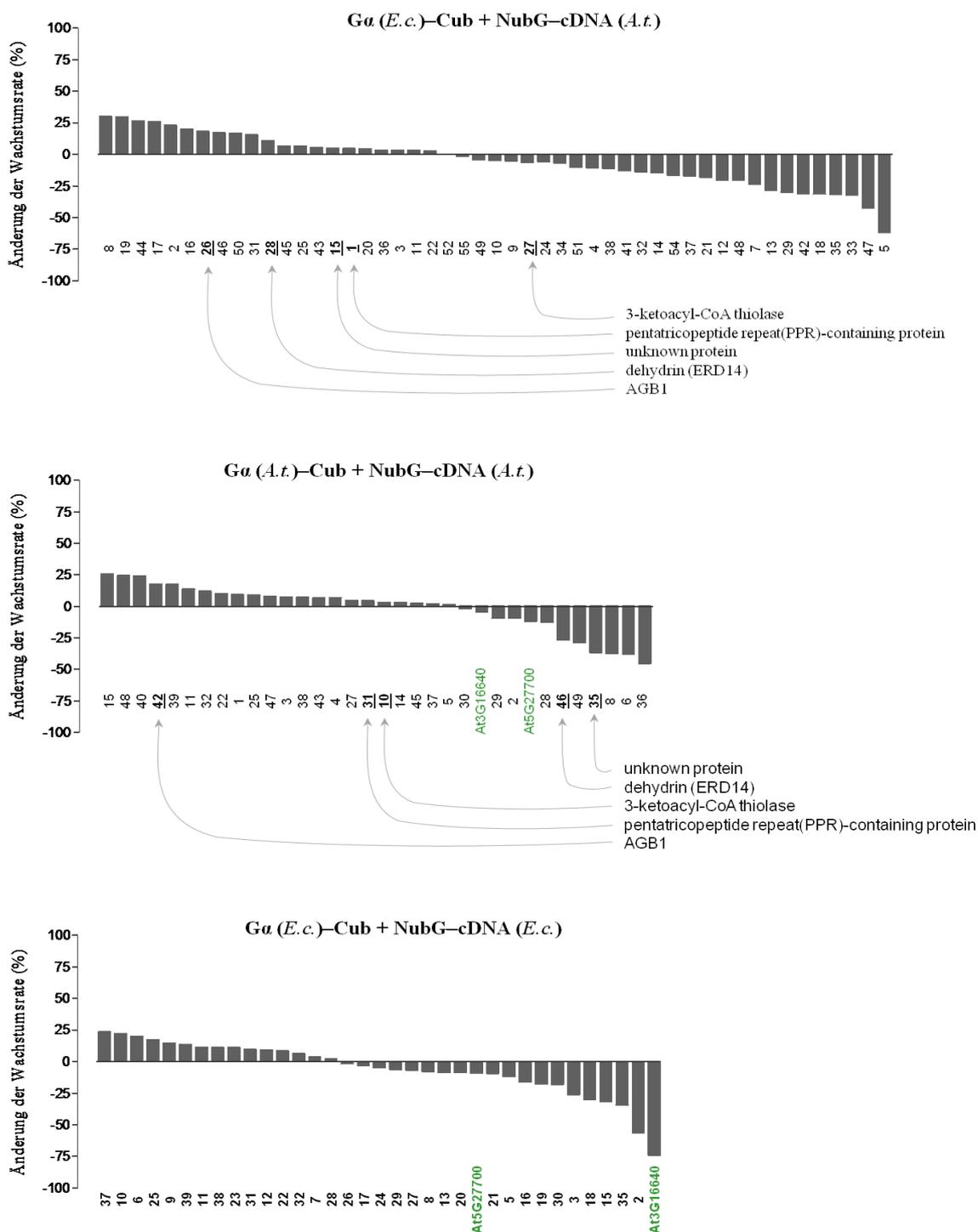


Abb. 26: Änderung der Wachstumsrate von Kolonien, welche mit $G\alpha$ interagierende Proteine bei hoher Stringenz exprimieren

Die auf der X-Achse aufgetragenen Nummern repräsentieren Kolonien, welche die cDNA eines interagierenden Proteins beinhalten (siehe Tabellen 18 – 20). Diese Kolonien wurden in Flüssigkultur (SC) angezogen, auf $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und jeweils $3 \mu\text{l}$ auf SC-Agarplatten, welche kein Met bzw. 2 mM Met enthielten, aufgetropft. Nach einer Inkubation von sieben Tagen bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Platten fotografiert und die Koloniegrößen mittels Bildanalyse ermittelt. Die Daten stellen Unterschiede der Koloniegrößen dar, normalisiert zur jeweils analogen Kolonie der Met-freien Agarplatte, welche als 100% festgelegt wurde. Fettgedruckt und unterstrichen sind diejenigen Interaktionsklone, welche bei den Paarungsexperimenten $G\alpha(E.c.)\text{-Cub} + \text{NubG-cDNA}(A.t.)$ und $G\alpha(A.t.)\text{-Cub} + \text{NubG-cDNA}(A.t.)$ gefunden wurden. Grün sind diejenigen Interaktionsklone dargestellt, die sowohl beim Paarungsexperiment $G\alpha(A.t.)\text{-Cub} + \text{NubG-cDNA}(A.t.)$ als auch $G\alpha(E.c.)\text{-Cub} + \text{NubG-cDNA}(E.c.)$ gefunden wurden.

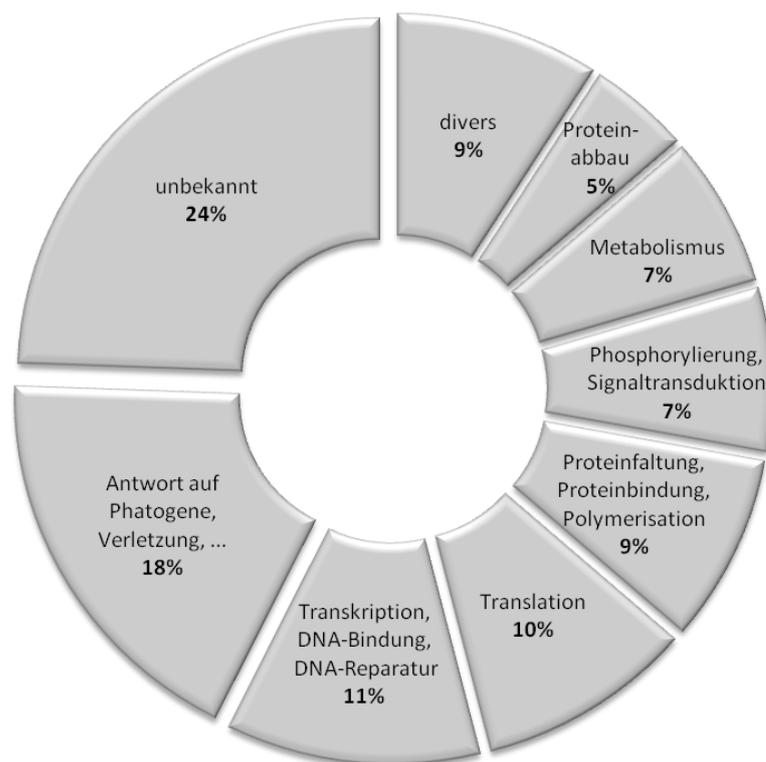


Abb. 27: Einteilung aller mit dem mating-based Split-Ubiquitin System identifizierten $G\alpha$ -Bindepertner in Funktionskategorien (TAIR-Datenbank)

Alle identifizierten $G\alpha$ -Bindepertner wurden aufgrund ihrer möglichen Funktion in Kategorien eingeteilt.

3.3.3 Suche nach PLA₂-Proteinen als potentielle Interaktoren von $G\alpha$

Wie unter Abschnitt 3.1 dargelegt, konnten auch in *Arabidopsis* Belege für eine Interaktion von $G\alpha$ und Phospholipase A₂ gefunden werden. Da diese allerdings im Rahmen von Funktions- und Aktivitätsanalysen erfolgten und bisher keine Sequenz der interagierenden PLA₂ in *Eschscholzia* oder *Arabidopsis* identifiziert werden konnte, sollten verschiedene PLA₂-Kandidaten mit Hilfe des etablierten mating-based Split-Ubiquitin Systems auf Interaktion mit $G\alpha$ getestet werden.

3.3.3.1 Suche nach PLA₂-Genen

In *Arabidopsis* konnten zehn Gene von patatin-ähnlichen Phospholipasen identifiziert werden (Holk *et al.*, 2002), während in *Eschscholzia* bisher keine PLA₂-Sequenzen bekannt sind. Aufgrund dessen wurde versucht anhand von Konsensus-Sequenzen der bekannten *Arabidopsis*-PLAs, wie dem katalytischen Zentrum (DGGGXRG) und dem Lipase-Motiv (GTSTG) (Holk *et al.*, 2002), eine *Eschscholzia*-PLA₂ über PCR zu amplifizieren. Als Template wurde sowohl die genomische, als auch die cDNA der *Eschscholzia*-Zellkultur

eingesetzt. Da dieser Ansatz nicht zum Erfolg führte, wurden alle vorhandene ESTs von *Eschscholzia* (Carlson *et al.*, 2006) mit der Proteindatenbank von *Arabidopsis* (WU-BLAST2 von TAIR) auf mögliche Phospholipasen durchsucht. Darunter befand sich nur ein EST (337221) mit Ähnlichkeit zu einer *Arabidopsis*-PLA₂ (PLA IIA, At2G26560). Eine weitere Sequenz einer patatin-ähnlichen Phospholipase (PhPatatin1) wurde von Frau Prof. Francesca Quattrocchio (Universität Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Gen aus *Petunia*, welches an der Kontrolle des vakuolären pH-Wertes beteiligt ist. Ein Proteinsequenzvergleich der drei potentiellen A₂-Phospholipasen ist aus Abbildung 28 ersichtlich.

Abb. 28: Aminosäuresequenzvergleich potentieller A₂-Phospholipasen

		20		40		60	
At2G26560	MQMDSPKSP	QPPTYGNLVT	ILSIDGGGIR	GLIPAVILGF	LESELQKLDG	EEARLADYFD	60
PhPatatin1	-----ATA	MCSVVAEV..I	...T..A..	..TQ..EM..	.DV.....	54
337221	-----	-----	V.....V..	...G.V.S.	...K..E...	..M.....	42
		80		100		120	
At2G26560	VIAGTSTGGL	VTAMLTAPNK	EGRPLFAASE	IKDFYLEQCP	KIFPQDHFPF	SAAKKL-VKS	119
PhPatatin1	L.S.IS..DE	NN...Y..KD	.VS..FQHG.	...ESW.GK	IGSTS---NM	111
337221	.V.....	LST.I...GA	N...YY..KD	LVQ...DH..	N...KRSRXL	TSYFW.DLNL	102
		140		160		180	
At2G26560	LTGPKYDGKY	LHQLIHAKLG	DTKLSQTLTN	VVIPTFDIKH	LQPTIFSSYE	VKNHPLKDAT	179
PhPatatin1	.W.....Q.	..K.LQNE..	E.R.H....H	I.....	F.....TNC.	.DAS.QL..K	171
337221	.P.-----	-----	-----	-----	-----	-----	105
		200		220		240	
At2G26560	LADIAISTSA	APTYLPAHFF	KVEDLNGNAK	EYNLIDGGVA	ANNPALLAIG	EVTNEISGGS	239
PhPatatin1	.S..C.G...H.	VND.GK..QY	.F.....C	...T.V.LS	T..KRVDSD	231
337221	-----	-----	-----	-----	-----	-----	105
		260		280		300	
At2G26560	SDFFPPIRPND	YGRFLVLSLG	TGNHKAEEKF	NAKEVAGWGL	LNWLTHDNST	PIIDAFSQAS	299
PhPatatin1	PA.YS.K.M.	CK.....	..TA.FDNI.	T.QDA.S..I	IG...HDFN	.L..V.T.QV	291
337221	-----	-----	-----	-----	-----	-----	105
		320		340		360	
At2G26560	SDMVDFHLSA	VFRAHLHSEAN	YIRIQDDTLT	GDAASVDIAT	VENLDILAKT	GDELLKKPVA	359
PhPatatin1	LTWLIIFPP	S.KL.KLVTI	ISEFKKMHYQ	EQLH...CC.	TD.MNK.VQV	.QN..M...S	351
337221	-----	-----	-----	-----	-----	-----	105
		380		400			
At2G26560	RVNLDSGCNE	NAYET-TNEH	ALIKLAGILS	KEKKIRDIRS	PHAKAPIRI		407
PhPatatin1	KL.FMT.SYD	KLENFG...E	..KRF.KL..	E...L.ASKA	SK-----		393
337221	-----	-----	-----	-----	-----		105

Der Aminosäuresequenzvergleich von *Arabidopsis* PLA IIA (At2G26560), *Petunia* PhPatatin1 und *Eschscholzia* EST 337221 wurde nach Anwendung der COBALT Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) erhalten und mittels des Programms CLC Sequence Viewer 6 (<http://www.clcbio.com/>) formatiert. Zwei hochkonservierte Sequenzmotive patatin-ähnlicher Phospholipasen sind blau hinterlegt, zum einen das katalytische Zentrum (DGGGXRG) und zum anderen das Lipase-Motiv (GTSTG) (Holk *et al.*, 2002). Die Sequenz von PhPatatin1 wurde dankenswerterweise von Frau Prof. Francesca Quattrocchio (Universität Amsterdam) zur Verfügung gestellt.

3.3.3.2 Test möglicher PLA₂-Proteine auf Bindepartner von G α mit Hilfe des mating-based Split-Ubiquitin Systems

Die cDNA-Sequenzen der drei interessanten PLA₂-Proteine aus *Eschscholzia* (EST 337221, Fragment von 315 bp), *Arabidopsis* (PLA IIA) und *Petunia* (PhPatatin1) (siehe Abschnitt 3.3.3.1) wurden durch Co-Transformation und homologe Rekombination in die entsprechenden Nub-Plasmide und den Hefestamm THY.AP5 gebracht. Anschließend wurde durch Paarung (Mating) mit dem Hefestamm THY.AP4, welcher das G α -Cub-PLV Fusionsprotein exprimiert, auf Interaktion mit G α getestet. In Abbildung 29 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Das *Arabidopsis*-Protein PLA IIA zeigte eine eindeutige Interaktion mit den G α -Proteinen von *Eschscholzia* und *Arabidopsis*, eine Bindung zwischen PhPatatin1 und G α war nicht feststellbar. Im Falle des aus *Eschscholzia* stammenden DNA-Fragmentes war auch bei der Positivkontrolle (NubWT-337221) kein Wachstum auf SC-Medium und Induktion von β -Galaktosidase erkennbar, so dass vermutet werden muss, dass die Klonierung nicht erfolgreich war. Infolgedessen kann eine Interaktion von EST 337221 und G α bis zum jetzigen Zeitpunkt weder bewiesen noch ausgeschlossen werden.

Für das Protein PhPatatin1 aus *Petunia* ist es gelungen, dessen cDNA in das Cub-Plasmid zu klonieren und so die Interaktion, mit den einzelnen G-Protein Untereinheiten zu untersuchen. Aus Abbildung 30 geht hervor, dass PhPatatin1 sehr stark mit G β (AGB1) interagiert und schwächer mit G α (GPA1). Dagegen ist keine signifikante Interaktion dieses Proteins mit dem *Eschscholzia* G α und G γ 2 (AGG2) nachweisbar. Die in diesem Experiment erhaltene Interaktion von PhPatatin1 und G α deutet auf eine günstigere Lokalisation des Fusionsproteins PhPatatin1-Cub gegenüber NubG-PhPatatin1 hin.

Das Potenzial des hier verwendeten Systems wird durch die Interaktion einer *Arabidopsis*-PLA₂ mit G α aus *Eschscholzia* und *Arabidopsis* aufgezeigt, auch wenn der Nachweis eines analog bindenden Proteins aus *Eschscholzia* noch aussteht. Damit gibt es für *Arabidopsis* erstmals eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen funktioneller Analysen und dem mating-based Split-Ubiquitin System zur Interaktion von PLA₂ und G α . Ob es sich dabei aber um das identische Protein handelt, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Die ebenfalls identifizierte Interaktion der patatin-ähnlichen Phospholipase aus *Petunia* (PhPatatin1) mit G β aus *Arabidopsis* könnte daraufhin weisen, dass diese Untereinheit allein oder im Komplex regulatorisch aktiv sein kann (Jones und Assmann, 2004).

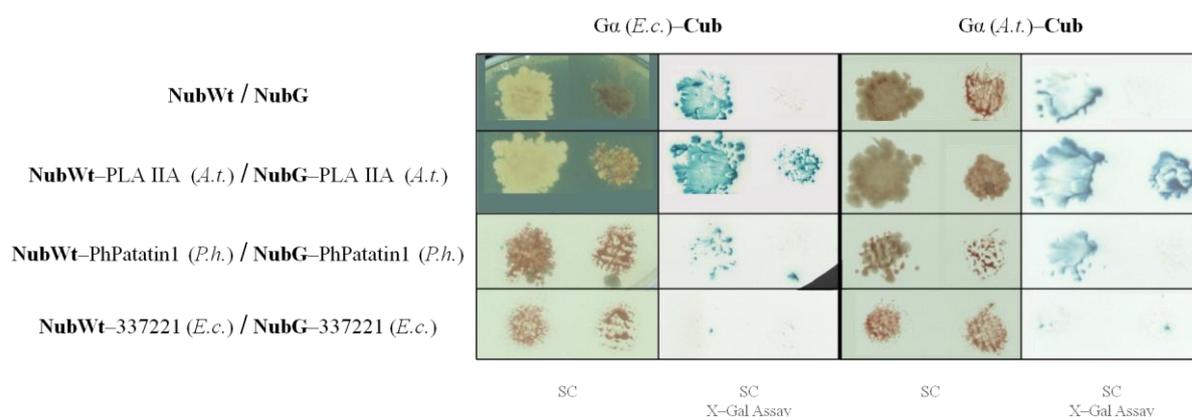


Abb. 29: Interaktion von *Gα* und potentiellen PLA₂-Proteinen

Durch sexuelle Vermehrung der haploiden Hefestämme THY.AP4 (beinhaltet *Gα*-Cub-PLV) und THY.AP5 (beinhaltet Nub fusioniert mit den cDNAs der potentiellen PLA₂-Gene) erhaltene diploide Hefekolonien wuchsen über einen Zeitraum von 9 d bei 30 °C auf Selektionemedium (SC) (linke Spalte, grüner Hintergrund). Anschließend wurden die Kolonien auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, woran sich ein X-Gal Assay anschloss (rechte Spalte, heller Hintergrund). Die paarweise angeordneten Kolonien zeigen jeweils links die Fusion mit NubWt (Positivkontrolle) und rechts mit NubG. Als weitere Kontrollen wurden Plasmide mit NubWt und NubG ohne Testproteine eingesetzt (erste Zeile).

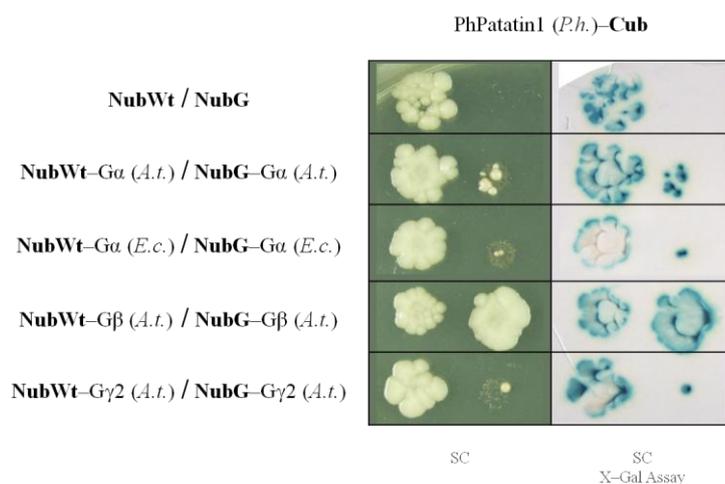


Abb. 30: Interaktion von PhPatatin1 und den Untereinheiten des G-Proteins

Durch sexuelle Vermehrung der haploiden Hefestämme THY.AP4 (beinhaltet PhPatatin1-Cub-PLV) und THY.AP5 (beinhaltet Nub fusioniert mit den cDNAs der G-Protein Untereinheiten) erhaltene diploide Hefekolonien wuchsen über einen Zeitraum von 9 d bei 30 °C auf Selektionemedium (SC) (linke Spalte, grüner Hintergrund). Anschließend wurden die Kolonien auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, woran sich ein X-Gal Assay anschloss (rechte Spalte, heller Hintergrund). Die paarweise angeordneten Kolonien zeigen jeweils links die Fusion mit NubWt (Positivkontrolle) und rechts mit NubG. Als weitere Kontrollen wurden Plasmide mit NubWt und NubG ohne Testproteine eingesetzt (erste Zeile)

4 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen des pflanzlichen G α -Proteins mit drei verschiedenen Methoden identifiziert: durch einen funktionellen Test (mit PLA₂ als ausgewähltem, potentiellen Effektorprotein), durch Co-Immunpräzipitation und vor allem über ein genetisch basiertes Verfahren, das mating-based Split-Ubiquitin System. Die letzte Methode lieferte die Hauptaussagen der Arbeit und wurde zugleich in ihrer Handhabung und Aussagekraft weiterentwickelt.

4.1 Die Kontrolle der Stringenz des mating-based Split-Ubiquitin Systems

Die erste Anwendung des mating-based Split-Ubiquitin Systems in seiner publizierten Version (Obrdlik *et al.*, 2004) lieferte eine enorme Anzahl an Klonen, die für ein G α -Bindepotein kodieren. Um diese zu ordnen und für weitere Untersuchungen nutzbar zu machen, war eine Klassifizierungsmethode erforderlich. Dabei stellte sich die Frage, ob die Stärke und die Art der Interaktion von G α und den bindenden Proteinen für die biologische Funktion wesentlich sind. Dazu liefert die vorliegende Arbeit einen neuen Ansatz, indem die Menge (und wahrscheinlich auch die Konzentration) des „suchenden“ Proteins G α („bait“) in Hefezellen kontrolliert erniedrigt wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass dadurch die Konkurrenz der Bindepartner verstärkt wird und ein Screenen der Interaktoren nach Bindestärke möglich macht. Die Verringerung von G α und damit die Erhöhung der Stringenz, begünstigt sehr wahrscheinlich das Wachstum von Klonen, die starke Interaktorproteine exprimieren. Die Tatsache, dass G β als einer der stärksten Interaktoren von G α -Proteinen verschiedener Pflanzen gefunden wurde, stimmt mit den Erwartungen überein und unterstützt die prinzipielle Richtigkeit dieser Annahme. Die gefundenen Klone des mating-based Split-Ubiquitin Systems sind also als echte Interaktoren einzustufen. Ein weiterer wichtiger Hinweis dafür ergibt sich daraus, dass vier Proteine, welche mittels Co-Immunpräzipitation als Interaktionspartner des *Arabidopsis* G α -Proteins identifiziert wurden, durch das mating-based Split-Ubiquitin System bestätigt werden konnten (siehe Abschnitt 3.2 und 3.3.2.3).

Die in dieser Arbeit vorgenommene Sortierung der G α -Interaktoren nach Bindungsstärke darf nicht so interpretiert werden, als ob schwächere Interaktoren (Klone, die nicht oder kaum auf Methionin-haltigem Nährboden wachsen können) keine Bedeutung im G-Protein kontrollierten Signaltransfer haben. Die bisher in *Arabidopsis* durch funktionelle und Mutationsstudien bekannten Zielenzyme von G α , wie Phospholipase D (Zhao und

Wang, 2004), Pirin (Lapik und Kaufman, 2003) oder Prephenatdehydratase (Warpeha *et al.*, 2006) waren nicht unter den hier gefundenen stark bindenden Interaktoren. Das könnte bedeuten, dass die durch $G\alpha$ regulierten Targets meist eine geringe Bindungsstärke aufweisen, etwa transiente Interaktionen beziehungsweise alternierende Assoziation und Dissoziation. Diese würden unter den hier verwendeten stringenten Bedingungen nicht erfasst. Die gefundenen starken Bindepartner bilden höchstwahrscheinlich *in vivo* stabile Komplexe mit $G\alpha$ und bestimmen damit deren Bindeeigenschaften gegenüber weiteren (zum Beispiel transienten) Partnern. Die bislang einzige Übereinstimmung zwischen einer funktionellen Interaktion und den mittels mating-based Split-Ubiquitin System detektierten Interaktionen, ohne Anwendung der erhöhten Stringenz, stellt die Interaktion von $G\alpha$ und PLA_2 dar (siehe Abschnitt 3.1 und 3.3.3.2).

Desweiteren sollte nicht außer acht gelassen werden, dass mit dem hier genutzten Versuchsaufbau des mating-based Split-Ubiquitin Systems nur paarweise Interaktionen detektiert werden können. Wenn für die Kontrolle eines Zielproteins durch $G\alpha$ die Bindung eines weiteren oder mehrerer Interaktionspartner (gleichzeitig oder sequentiell) benötigt wird, kann diese nicht entdeckt werden. Unter den hier detektierten Bindepartnern befinden sich sehr wahrscheinlich Proteine, welche in der Pflanze Bestandteile größerer Komplexe sind und neben $G\alpha$ mehrere andere Proteine beinhalten, ähnlich denen in der Plasmamembran von Reis gefundenen, circa 400 kDa großen Komplexen, die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins beinhalten (Kato *et al.*, 2004). Solche Komplexe könnten die Aktivität und Spezifität des $G\alpha$ -Proteins festlegen und so die Regulation von (schwach interagierenden) Zielproteinen ermöglichen.

Ein Grundproblem des mating-based Split-Ubiquitin Systems besteht natürlich auch darin, dass die Interaktion der Proteine in Hefezellen stattfindet und diese nur auf eine prinzipielle Bindungsbereitschaft mit $G\alpha$ hinweist. Genau wie beim Yeast-2-Hybrid System ist die gefundene Interaktion nicht zwangsläufig und in gleicher Stärke in der pflanzlichen Zelle zu erwarten.

4.2 Bindung von genregulatorischen Proteinen – ein neuer Wirkmechanismus von $G\alpha$?

Unter den identifizierten $G\alpha$ -bindenden Proteinen befinden sich mehrere Transkriptionsfaktoren, welche in Tabelle 23 zusammenfassend dargestellt sind.

Den größten Anteil haben Transkriptionsfaktoren der Zink-Finger Familie, wie zum Beispiel

TFIIB. Pan *et al.* (2000) konnten zeigen, dass dieser zusammen mit einem TATA binding protein (TBP) erforderlich für die Aktivierung der Transkription ist. Ein weiterer Interaktionspartner ist AtBZIP10, ein Transkriptionsfaktor der Leucin-Zipper (bZIP) Familie. Dieser ist nach Komplexbildung mit weiteren bZIP-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* an der Regulation von Genen der Samenentwicklung beteiligt (Alonso *et al.*, 2009). Neben diesen „klassischen“ Transkriptionsfaktoren wurde auch der pflanzentypische Transkriptionsfaktor NTL6 der NAC¹ Familie identifiziert. NTL6 ist ein Membran-gebundenes Protein, welches an der biotischen sowie abiotischen Stressantwort beteiligt ist (Seo *et al.*, 2010). Es wird durch Kälte proteolytisch aktiviert und induziert die Expression von Pathogen-angestoßenen (PR) Genen (Seo *et al.*, 2010). Bei dem in *Eschscholzia* gefundenen Homologon, agamous-like 14, handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor, denn dessen hoch konservierte MADS²-Domäne weist Ähnlichkeiten zu bekannten Transkriptionsfaktoren von Mensch und Hefe auf (Norman *et al.*, 1988; Passmore *et al.*, 1988). In *Arabidopsis* sind viele agamous (AG) Gene essentiell für die Ausbildung der Sexualorgane (Staubfäden und Karpelle) in den Blüten (Yanofsky *et al.*, 1990). Für die RNA von agamous-like 14 (AGL14) und zwei weiteren AGL-Genen konnten Rounsley *et al.* (1995) eine ausschließliche Expression in der Wurzel zeigen. Die bisher allein der Blütenbildung zugeordneten MADS-Box-Gene könnten also eine weitaus größere Rolle bei der pflanzlichen Entwicklung spielen.

Diese Ergebnisse eröffnen die attraktive Perspektive, dass G α an der Transkriptionskontrolle auf DNA-Ebene beteiligt ist: die Bindung von genregulatorischen Proteinen an der Plasmamembran würde deren Verfügbarkeit in der Zelle und damit im Zellkern vermindern, bis es durch ein äußeres Signal, etwa über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, zur Freisetzung dieser Proteine und zur Genaktivierung kommt. Über verschiedene Bindungsstärken und Komplexpartner sind damit vielfältige Szenarien vorstellbar. Dieser Mechanismus unterscheidet sich grundsätzlich vom bisher bekannten, klassischen Wirkmechanismus auf der Ebene des Signaltransfers, welcher ein Zielenzym voraussetzt, das nach Interaktion mit G-Protein Untereinheiten einen Botenstoff (cAMP, LPC etc.) freisetzt. Eine direkte Wirkung der G-Proteine auf Transkriptionsfaktoren ist bisher auch in tierischen Zellen unbekannt.

¹ NAM (no apical meristem), ATAF1/2, CUC2 (cup-shaped cotyledons 2)

² MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF (serum response factor)

Tab. 23: Mit $G\alpha$ interagierende Transkriptionsfaktoren

AtG Nummer	Bezeichnung (Annotation)	Familie	gefunden mit $G\alpha$ aus	Referenz
At1G51200 ⁵	zinc finger (AN1-like)	Zink-Finger	<i>Eschscholzia</i>	Vij und Tyagi, 2006
At2G41630	TFIIB	Zink-Finger	<i>Eschscholzia</i>	Pan <i>et al.</i> , 2000
At4G02640	basic leucine zipper (AtBZIP10)	Leucin-Zipper	<i>Arabidopsis</i>	Alonso <i>et al.</i> , 2009
At4G11880	agamous-like 14	MADS-Box	<i>Eschscholzia</i>	Rounsley <i>et al.</i> , 1995
At2G20280 ⁴	zinc finger (CCCH-type)	Zink-Finger	<i>Eschscholzia</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008
At3G49530	NTL6	NAC	<i>Eschscholzia</i>	Seo <i>et al.</i> , 2010

Hochgestellte Zahlen zeigen, wie oft ein Interaktionsklon gefunden wurde. Grau hinterlegt sind Proteine mit einer positiven Wachstumsdifferenz, die zu den stärksten Bindepartnern gezählt werden. Schwarz umrahmt ist ein in *Eschscholzia* gefundenes Protein, angegeben als Sequenz-Homologon aus *Arabidopsis*.

4.3 Spezies-spezifischer Unterschied der Bindungseigenschaften von $G\alpha$

Bei einem Vergleich der in den Tabellen 18 – 21 (siehe Abschnitt 3.3.2.3) aufgeführten Interaktoren fallen erhebliche Unterschiede innerhalb der Bindepartner der $G\alpha$ -Proteine von *Arabidopsis* und *Eschscholzia* auf.

Das gilt zunächst für die „homologen“ Versuchsansätze, also $G\alpha$ (*A.t.*) + cDNA (*A.t.*) und $G\alpha$ (*E.c.*) + cDNA (*E.c.*). Auch wenn berücksichtigt wird, dass die *Eschscholzia*-Proteine nicht als solche bekannt (annotiert) sind und hier durch ihre Sequenz-Homologen aus *Arabidopsis* ersetzt wurden, ist auffallend, dass die spezies-spezifischen $G\alpha$ -Bindeproteine zwischen beiden Pflanzen bis auf drei Proteine völlig verschieden sind.

Die Bindspezifität der $G\alpha$ -Proteine beider Pflanzen wurde durch die Suche in derselben cDNA-Expressionsbank von *Arabidopsis* getestet. Dieser „heterologen“ Versuchsansätze lieferten 13 Proteine (siehe Tabelle 22, Abschnitt 3.3.2.3), welche mit beiden untersuchten $G\alpha$ -Proteinen interagieren. Darunter befinden sich zwei Proteine, die das $G\alpha$ beider Spezies stark binden:

- das $G\beta$ -Protein, was die prinzipielle Korrektheit des angewandten Systems und die Erwartung bestätigt. Denn die Bindedomäne für $G\beta$ (welches, wie $G\alpha$ in jeder Spezies nur einmal vorkommt) ist in den $G\alpha$ -Proteinen sehr ähnlich (siehe Anhang I).
- das bisher noch nicht als $G\alpha$ -bindend beschriebene pentatricopeptide repeat (PPR)-containing protein. Es gehört zu einer großen Proteinfamilie (~ 450 Gene in *Arabidopsis*) und

kommt vorwiegend in Landpflanzen vor (Schmitz-Linneweber und Small, 2008), wo es vermutlich eine essentielle Rolle bei der Genexpression von Organellen spielt (Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

Die Proteine, 3-ketoacyl-CoA thiolase, dehydrin (ERD14) und ein unbekanntes Protein, deren Bindungsstärken mit Hilfe des Wachstumstests bestimmt wurden, interagieren stark mit dem $G\alpha$ der einen Spezies aber deutlich schwächer mit dem anderen $G\alpha$. Für die übrigen acht der dreizehn *Arabidopsis*-Proteine konnte die Bestimmung der Interaktionsstärke nicht oder nur mit einem $G\alpha$ -Protein durchgeführt werden. Es lässt sich so zwar kein Vergleich der Bindungsstärken aufstellen, aber eine Interaktion mit $G\alpha$ bei Anwendung der hohen Stringenz konnte gezeigt werden. Etwas überraschend war, dass sich die mit $G\alpha$ aus *Eschscholzia* interagierenden *Arabidopsis*-Proteine mehrheitlich von denen im Versuchsansatz $G\alpha$ (*A.t.*) + cDNA (*A.t.*) gefundenen unterscheiden. Nach dem hier erreichten Erkenntnisstand (fünfmalige Wiederholung der Banksuche) hat das $G\alpha$ aus *Eschscholzia* eine andere Präferenz gegenüber *Arabidopsis*-Proteinen als das spezies-gleiche $G\alpha$. Die naheliegende Vermutung auf eine unterschiedliche Spezifität der $G\alpha$ -Proteine für Proteine der eigenen Spezies könnte weiter erhärtet werden, wenn alle Bindeproteine im Rahmen des vorgestellten mating-based Split-Ubiquitin Systems identifiziert wurden.

Die erheblichen Unterschiede im Spektrum der Bindepartner beider $G\alpha$ -Proteine sind umso erstaunlicher, da sie auf relativ geringen Sequenzunterschieden basieren. Wie dem Aminosäuresequenzvergleich pflanzlicher $G\alpha$ -Proteine im Anhang I zu entnehmen ist, weisen die zehn aufgeführten Sequenzen insgesamt eine weitgehende Homologie auf, zeigen aber Unterschiede vor allem in der N-terminalen Hälfte. Trotz der großen evolutionären Distanz zwischen Papaveraceen und Brassicaceen haben die $G\alpha$ -Proteine von *Eschscholzia* und *Arabidopsis* eine Sequenzidentität von 83 % (Abbildung 31). Die geringen Sequenzunterschiede könnten aber durchaus verschiedene Bindedomänen erklären. Temple und Jones (2007) sowie Tuteja und Sopory (2008) vermuten zwar die Effektor-bindenden Domänen, analog zum tierischen System, eher am C-Terminus, aber nach bisherigem Erkenntnisstand konnten für kein Effektorprotein die interagierenden Aminosäuren des pflanzlichen $G\alpha$ -Proteins identifiziert werden.

Dennoch existiert ein geringes Maß an Übereinstimmungen innerhalb aller gefundenen $G\alpha$ -bindenden Proteine. Ein Teil der beim ersten Versuchsansatz $G\alpha$ (*E.c.*) + cDNA (*A.t.*) erhaltenen Interaktoren (geringe Stringenz), zeigten nach Isolierung der Vektoren und einem weiteren Interaktionstest mit $G\alpha$ (*A.t.*) ein positives Ergebnis. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Diversität der Bindepartner erst durch Anwendung hoher Stringenz sichtbar wird.

		20		40		60	
Arabidopsis	MGLLCSRSRH	HTE-DTDENT	QAAEIERRIE	QEAKAEKHIR	KLLLLGAGES	GKSTIFKQIK	59
Eschscholzia	..S....HN.	RN.G.SE..VK..A	..T.....Q	60
		80		100		120	
Arabidopsis	LLFQTGFDEG	ELKSYVPVIH	ANVYQTIKLL	HDGTKEFAQN	ETDSAKYMLS	SESIAIGEKL	119
EschscholziaDATS..YV.	...A...SET	.E..S..L..	P.NRD.....	120
		140		160		180	
Arabidopsis	SEIGGRLDYP	RLTKDIAEGI	ETLWKDPAIQ	ETCARGNELQ	VPDCTKYLME	NLKRLSDINY	179
Eschscholzia	.G..S...H.	...AEL.HE.S.V.	..YT.....	L...AH.F..	..Q....V..	180
		200		220		240	
Arabidopsis	IPTKEDVLYA	RVRTTGVEEI	QFSPVGENKK	SGEVYRLFDV	GGQRNERRKW	IHLFEGVTAV	239
Eschscholzia	V.....H.S.....N..	240
		260		280		300	
Arabidopsis	IFCAAISEYD	QTLFEDEQKN	RMMETKELFD	WVLKQPCFEK	TSFMLFLNKF	DIFEKKVLDV	299
EschscholziaM.....N..EV.....Q.	300
		320		340		360	
Arabidopsis	PLNVCEWFRD	YQPVSSGKQE	IEHAYEFVKK	KFEELYQNT	APDRVDRVFK	IYRTTALDQK	359
EschscholziaD..K.T....	..N.....M.F.S.	G.....	V.....	360
		380					
Arabidopsis	LVKKTFKLVD	ETLRRRNLE	AGLL				383
Eschscholzia				384

Abb. 31: Aminosäuresequenzvergleich der $G\alpha$ -Proteine von *Eschscholzia* und *Arabidopsis*

Der Aminosäuresequenzvergleich wurde nach Anwendung der COBALT Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) erhalten und mittels des Programms CLC Sequence Viewer 6 (<http://www.clcbio.com/>) formatiert.

4.4 PLA_2 – Target von $G\alpha$

Wie bereits mehrfach erwähnt, konnten in *Eschscholzia californica* zahlreiche Belege für die Existenz eines Komplexes von $G\alpha$ und PLA_2 gefunden werden. Allerdings wurde die Identität des durch $G\alpha$ kontrollierten Enzyms Phospholipase A_2 weder auf DNA- noch auf Proteinebene ermittelt.

Diese Arbeit hat das Vorhandensein des $G\alpha / PLA_2$ -Komplexes in der Plasmamembran eines weiteren pflanzlichen Organismus, *Arabidopsis thaliana*, anhand der Aktivität des Enzyms untersucht und bestätigt. Auch hier kann der Komplex durch pH-Erhöhung dissoziiert und die PLA_2 -Aktivität im Co-Immunpräzipitat nach Zusatz von $GTP\gamma S$ stimuliert werden. Eine Aktivierung der Phospholipase A_2 durch Effektoren von $G\alpha$ im gleichen Co-Immunpräzipitat weist auf eine besonders enge Kopplung der beiden Proteine hin, das heißt der Komplex $G\alpha / PLA_2$ sollte bereits präformiert in der Zelle vorgelegen haben. Wie von Viehweger *et al.* (2006) und Heinze *et al.* (2007) beschrieben, wird über diesen Komplex in *Eschscholzia*

californica die Biosynthese der Benzophenanthridinalkaloide und somit eine Abwehrreaktion ausgelöst. Welchen biologischen Zweck die physikalische Interaktion zwischen $G\alpha$ und PLA_2 in *Arabidopsis thaliana* erfüllt, ist bisher noch ungeklärt. Auch wenn eine Übereinstimmung der mittels mating-based Split-Ubiquitin System interagierenden potentiellen PLA_2 -Proteine mit der in der Plasmamembran gemessenen PLA_2 noch nicht gezeigt ist, liefert dieses Ergebnis einen wichtigen Anhaltspunkt, um diesem Schluss näherzukommen (zum Beispiel über heterologe Expression und Mutagenese dieser PLA_2 -Proteine).

Für das Protein PhPatatin1 aus *Petunia* wurde auch eine Interaktion mit $G\beta$ (*Arabidopsis*) gezeigt. Dies deutet auf eine eigenständige Rolle von $G\beta$ im Signaltransfer hin, welche bisher vernachlässigt wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der $G\alpha / PLA_2$ -Komplex in der Plasmamembran von *Eschscholzia* und *Arabidopsis* außerdem $G\beta$ enthält, welches als (zusätzlicher) Bindepartner dient.

Unklar bleibt, warum beim Durchsuchen der cDNA-Expressionsbanken mittels des mating-based Split-Ubiquitin Systems unter Anwendung hoher Stringenz kein Protein mit PLA_2 -Aktivität gefunden wurde. Dies kann vor allem an der Unvollständigkeit bei der Erfassung aller Interaktoren liegen (Abschnitt 3.3.2.3), denn eine fünfmalige Wiederholung stellte sich als nicht ausreichend heraus, um alle starken Bindepartner zu erfassen. Wenn PLA_2 entgegen der Annahmen aber eher zu den schwach oder alternierend bindenden Proteinen zählt, kann diese bei hoher Stringenz und damit einer geringen Verfügbarkeit von $G\alpha$ nicht mehr gefunden werden. Denkbar wäre auch, dass für die Kontrolle der PLA_2 durch $G\alpha$ weitere Proteine benötigt werden. Desweiteren könnte sich eine patatin-ähnliche Phospholipase unter den 24% bisher nicht annotierten Proteinen verbergen. Dies ist sicher wahrscheinlicher für *Eschscholzia*, da für *Arabidopsis* bereits zehn Gene (Holk *et al.*, 2002) identifiziert wurden und das Genom komplett sequenziert ist. In *Eschscholzia* dagegen sind nur wenige Proteine und ihre Sequenzen bekannt.

4.5 Ausblick

Die erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass das pflanzliche $G\alpha$ eine weit größere Anzahl an Bindepartner besitzt, als bisher angenommen wurde. Bei der Anordnung nach Bindungsstärke nimmt $G\beta$ eine führende Position ein, welches im tierischen System als fester Bestandteil des G-Protein Signalzyklus bekannt ist (siehe Abschnitt 1.1.2.1). Da mit dem bisher verfügbaren mating-based Split-Ubiquitin System jeweils nur ein Protein auf Interaktion mit $G\alpha$ getestet werden konnte, das Vorhandensein von größeren $G\alpha$ -Komplexen aber wahrscheinlich ist, sollten in zukünftigen Experimenten die Bindepartner, mit einem Hefestamm getestet werden, der $G\alpha$ und $G\beta$ co-exprimiert. Tatsächlich wurde das mating-based Split-Ubiquitin System zwischenzeitlich erweitert und es ist möglich ein weiteres Bindeprotein einzubringen (SUS „Bridge Assay“, Grefen *et al.*, 2009). Desweiteren sollten solche Untersuchungen auch mit dem in *Arabidopsis* identifizierten G-Protein gekoppelte Rezeptor GCR1 als dritten Komplexpartner durchgeführt werden.

Eine funktionsbezogene Auswahl der gefundenen Bindepartner sollte *in vitro* sowie *in vivo* überprüft und gegebenenfalls bestätigt werden. Zu den dafür geeigneten Methoden zählen die Proteinüberexpression und anschließend durchgeführte Bindungsstudien an immobilisierten Materialien, sowie Pulldown-Assays. Bereits vorhandene oder eigens dafür hergestellte Antikörper gegen die ermittelten Bindepartner tragen ebenfalls zur Untersuchung der $G\alpha$ -Komplexe isolierter Proteinextrakte bei.

Ein in zukünftigen Arbeiten zu lösendes Problem bleibt die Suche nach schwachen beziehungsweise alternierend bindenden Interaktoren, unter denen mit großer Wahrscheinlichkeit die durch $G\alpha$ direkt kontrollierten Targets erwartet werden können. Deshalb kann auch zukünftig auf eine funktionelle Suche nach Interaktionspartnern / Signalmolekülen nicht verzichtet werden.

5 ANHANG

Anhang I: Aminosäuresequenzvergleich pflanzlicher Gα-Proteine

Arabidopsis	-----MG	LLCSRSRHHT	E-DTENTQA	AEIERRIEQE	AKAEKHIRKL	LLL	GAGESGK	51
Lotus	-----	..KN.RYN	DA.E..T	52
Pisum	-----	..K.NRYN	DAKAE.A.T	52
Solanum	-----	..S...NK.YS	QA.DE..TD	52
Nicotiana	-----N.KGYN	QA.DE..T	..D.....D	52
Phaseolus	-----N.RYN	DA.AE.A.TD	52
Ricinus	MLSSVVHN	..S...KQ.RYN	A.AE.A..D	60
Lupinus	-----N.RYN	DA.AE.A..D	52
Eschscholzia	-----	..S...HN.RN	G.SE.V..D	52
Oryza	-----	..SS...HSL	.AE.TK.AKS	..D.D..LD	52
Arabidopsis	STIFKQIKLL	FQTGFDEGEL	KSYVPVIHAN	VYQTIKLLHD	GTKEFAQNET	DSAKYMLSSSE		111
LotusAQ		112
PisumAL.V		112
SolanumAN.I		112
NicotianaAN.I		112
PhaseolusAL		112
RicinusSSII		120
LupinusAL		112
EschscholziaDATS.Y		112
OryzaAR.TS		112
Arabidopsis	SIAIGEKLS	IGGRLDYPRL	TKDIAEGIET	LWKDPAIQET	CARGNELQVP	DCTKYLMLN		171
LotusNKECEL.LE.N		172
PisumNKDEL.QE.S		172
SolanumNKELVQD.A		172
NicotianaNKDHLVQD.A		172
PhaseolusNKEHEL.QE.N		172
RicinusNKDCEL.KE		180
LupinusNKDSKY.TEL.KE		172
EschscholziaNRDGS.H		172
OryzaNQEDL.N.ELVLDV		172
Arabidopsis	KRLSDINYIP	TKEDVLYARV	RTTGVEIQF	SPVGENKKS	EVYRIFDVGG	QRNERKWIH		231
LotusHA.VD		232
PisumQA.VL		232
SolanumE.FHF.I		232
NicotianaQ.FVS		232
PhaseolusQA.V		232
RicinusQA.V		240
LupinusQA.V		232
EschscholziaQV.VH		232
OryzaDAEAG.VN.Q		232
Arabidopsis	LEEGVTAVIF	CAAISEYDQT	LFEDEQKNRM	METKELFDWV	LKQPCFEKTS	FMLFLNKFDI		291
LotusSN		292
PisumSVN		292
SolanumSR		292
NicotianaSGR		292
PhaseolusSNR		292
RicinusSN		300
LupinusSN		292
EschscholziaNMN		292
OryzaNMT		292
Arabidopsis	FEKKVLDVPL	NVCEWFRDYQ	PVSSGQKEIE	HAYEFVKKKF	EELYQNTAP	DRVDRVFKIY		351
LotusSI.KK		352
PisumSI.KK		352
SolanumSI.KK		352
NicotianaSI.KK		352
PhaseolusSI.KK		352
RicinusSI.KK		360
LupinusSI.KK		352
EschscholziaSI.KK		352
OryzaSI.KK		352
Arabidopsis	RTALDQKLV	KKTFKLVD	LRRRNLEAG	LL				383
LotusVF	384
PisumVF	384
SolanumVF	384
NicotianaVF	384
PhaseolusVF	384
RicinusISF	392
LupinusISF	384
EschscholziaISF	384
OryzaISMSRET	380

Der Aminosäuresequenzvergleich wurde nach Anwendung der COBAT Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) erhalten und mittels des Programms CLC Sequence Viewer 6 (<http://www.clcbio.com/>) formatiert. Farblich hinterlegt sind der P-Loop für die Nucleosidtriphosphat-Bindung (grün), das DxxGQ-Motiv für die Hydrolyse von Guanintriposphat (blau) und das NKxD Motiv für die Guanin-Erkennung (rot). Die Interaktion mit dem Gβγ-Dimer entsteht an drei Regionen, der N-terminalen Region, einem kleinen Bereich in switch I und einem großen Bereich in switch II. (Jones und Assmann, 2007). Die beim Kontakte zum Gβγ-Dimer benötigten Aminosäuren sind gelb eingekreist.

Anhang II: DNA-Sequenzen

Ga (*Eschscholzia*), 1.152 bp

```

 1 ATGGGCTCAC TCTGCAGCAG ACACAATCAT CGAAATGAAG GCGACTCGGA AGAAAATGTG
61 CAGGCTGCAG AGATTGAGAA GCGGATAGCT CAAGAAACAA AAGCCGAGAA GCACATCCAA
121 AAAC TTCTGC TACTTGGGGC TGGAGAGTCA GGAAGTCTA CAATTTTCAA GCAGATAAAG
181 CTTTTGTTTC AAAC TGGTTT TGATGATGCC GAACTAAAGA GCTATACCTC AGTTATCTAT
241 GCCAATGTGT ACCAGACAAT TAAAGTATTA CATGATGGAG CAAAGGAATT TTCTGAGACT
301 GAAGAAGATT CATCAAAATA TCTTTTATCT CCGGAAAATC GGGATATTGG AGAGAAGCTA
361 TCTGGAATTG GAAGTAGGTT GGATCATCCA CGTCTGACTG CAGAGCTCGC ACATGAAATA
421 GAAACTTTAT GGAAGGATTC TGCAGTTCAG GAAACTTATA CTCGCGGAAA TGAAC TGCAA
481 CTTCCAGACT GTGCACACTA TTTTCATGGAG AACTTACAAA GATTGTCTGA TGTTAATTAT
541 GTCCCAACCA AGGAAGATGT ACTTCATGCA AGAGTTCGTA CATCTGGCGT CGTGGAAATC
601 CAATTCAGCC CTGTTGGAGA GAACAAAAAA AGTGGTGAAG TTTATAGACT ATTTGATGTT
661 GGAGGTCAGA GAAATGAGAG AAGAAAGTGG ATTCATTTAT TTGAAGGGT TAATGCTGTG
721 ATCTTTTGTG CTGCAATTAG CGAGTACGAC CAAATGCTCT TTGAAGATGA AAAAAGAAG
781 CGGATGATGG AAACAAAGGA GCTCTTTGAA TGGGTTCTGA AGCAGCCATG TTTTGAGAAA
841 ACATCGTTCA TGCTATTTCT CAACAAGTTC GATGTATTTG AGAAGAAAGT CCTACAAGTA
901 CCATTAAATG TGTGCGATTG GTTCAAGGAT TACCAGCCTG TGTCGACAGG AAAACAAGAG
961 ATTGAGAATG CGTATGAGTT TGTAAAGAAG AAATTCGAAG AAATGTACTT CCAGAGTACT
1021 GGTCCCTGATC GTGTCGACCG AGTATTCAAA GTCTACCGAA CGACAGCTCT AGATCAAAAG
1081 CTCGTCAAAA AACATTCAA ATTGGTAGAC GAGACTTTAA GGAGGAGAAA CCTTCTCGAA
1141 GCAGGTCTAT TA

```

Die DNA-Sequenz wurde der Doktorarbeit von Wieland Schwartze (2007) entnommen.

EST 337221 (*Eschscholzia*), 319 bp

```

 1 TGGTAACAGT GTTGAGTATA GATGGAGGAG GTGTAAGAGG TTTAATCCCC GCGTTCGTCC
61 TCTCTTTTCT CGAATCTAAG CTCCAGGAAC TCGATGGAGA GGAAATGAGG CTAGCAGATT
121 ATTTTCGATGT AGTGGCTGGT ACGAGTACGG GTGGGCTACT AAGCACCATG ATCACAGCCC
181 CTGGGGCGAA TGGTTCGACCT TATTATGCTG CTAAAGATCT TGTTTCAGTTC TACCTTGATC
241 ATTGTCCCTAA CATCTTCCCT AAAAGAAGCA GGTGACTGAC TTCTTATTTT TGGCTCGATC
301 TCAACCTTTT ACCTGGTCC

```

Die DNA-Sequenz wurde der EST-Datenbank von *Eschscholzia* aus Blütenknospen oder Zellkultur (Floral Genom Projekt der Ohio State University, Carlson *et al.*, 2006) entnommen.

PhPatatin1 (*Petunia*), 1.180 bp

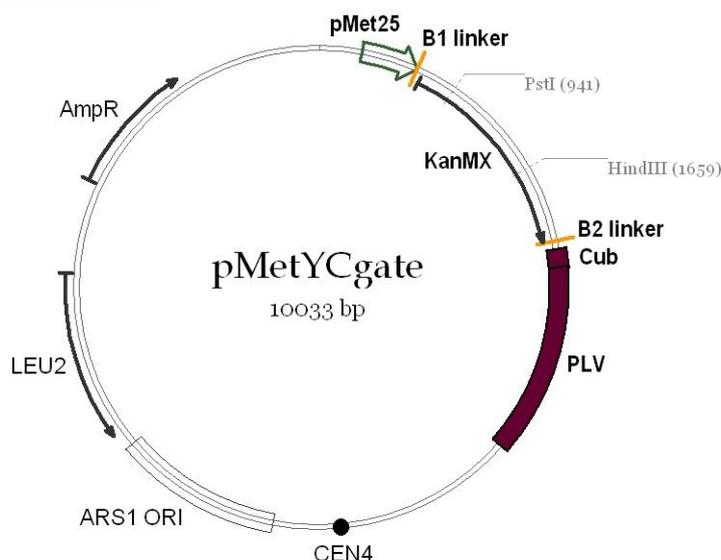
```

1  ATGGCAACAG CAATGTGCTC TGTGGTTGCA GAAGTGGTCA CTATTCTTAG CATTGATGGA
61  GGTGGCATTG GAGGCATCAT TCCAGCTACT ATTCTTGCTT TCCTTGAAAC CCAACTCCAG
121 GAAATGGATG GTGAAGATGT TAGACTTGCA GATTATTTTG ATGTAATAGC AGGAACAAGT
181 ACAGGTGGTT TATTGACCAG TATGATAAGT GCTCCAGATG AAAATAATCG TCCTTTGTAT
241 GCTGCCAAG  ATATTGTGTC ATTTTATTTT CAACATGGCC CTAATAATTT CCCAGAAAGC
301 TGGTTTGGAA AGATTGGAAG TACATCTAAC ATGCTATGGG GCCCTAAATA TGATGGACAA
361 TACCTACACA AACTTCTGCA AAATGAGTTG GGAGAAACTC GTTTGCATCA GACTTTAACT
421 CATATCGTTA TTCCAACCTT TGACATCAAG CACTTTCAGC CAACAATATT CACCAATTGT
481 GAGGTAGATG CGTCTCCCAG TTGGATGCTA AGTTGTCAGA CATATGCATT GGTACCTCAG
541 CAGCTCCAAC ATATCTACCA GCACATCACT TTGTGAATGA TGGTGGTAAA GGCAATCAAT
601 ATGAATTCAT CTCATTGATG GTGGTGTTTG TGCCAATAAC CCGACATTAG TGCACCTAGC
661 ACCGTAACCA AACGTGTGGA TGATTGAGAT CCAGCATTCT ACTCAATCAA GCCAATGGAC
721 TGTAAGAGAT TTCTGGTACT CTCGTTGGGG ACTGGCACGG CTAATTTTGA TAACATATTC
781 ACAGCACAAG ATGCTGCAAG TCGGGGAATA ATAGGGTGGC TCACTACCA  TGATTTCAAC
841 CCTTTAATTG ATGTGTTTAC AGCAGCAAGT GCTGACATGG TTGATTATTA TATTTCCACC
901 ATCTTTCAAG CTGTTAAAGC TGGTGACAAT TATCTCCGAA TTCAAGAAAA TGCATTATCA
961 GGAACAGCTG CATCAGTGGA TTGTTGTACA ACGGATAATA TGAACAAACT TGTACAAGTT
1021 GGTCAAAACT TGTTGATGAA ACCTGTTTCC AACTGAACT TTATGACTGG ATCATACGAC
1081 AACTTGAGA ATTTTGAAC CAATGAGGAA GCTCTAAAGA GTTTGCAAA GTTACTGTCA
1141 GAAGAGAAGA AACTCAGAGC AAGCAAAGCC TCTAGATAA
    
```

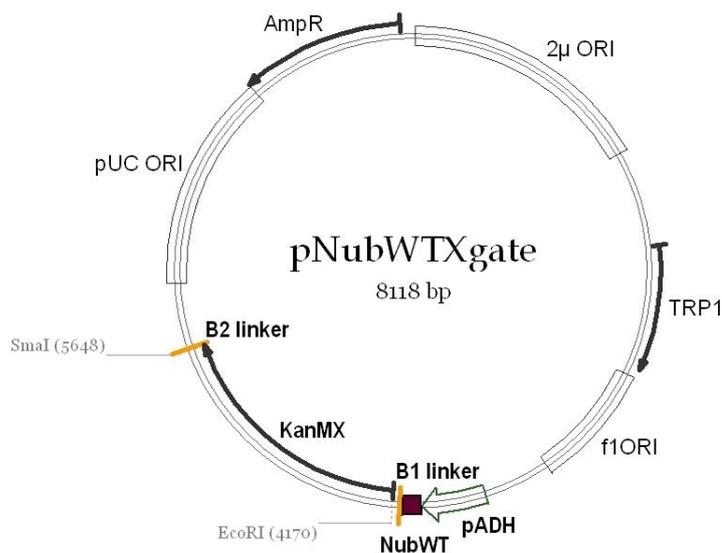
Die DNA-Sequenz wurde von Frau Prof. Francesca Quattrocchio (Universität Amsterdam) zur Verfügung gestellt.

Anhang III: Vektorkarten

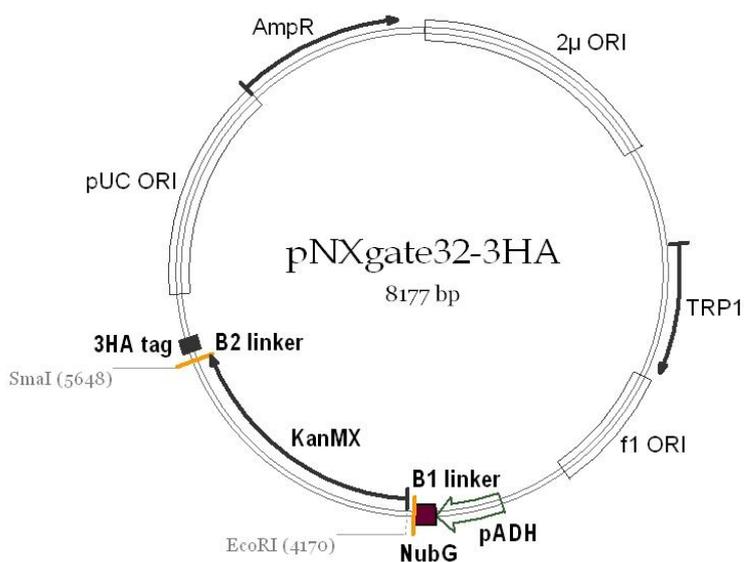
pMetYCgate (Obrdlik *et al.*, 2004)



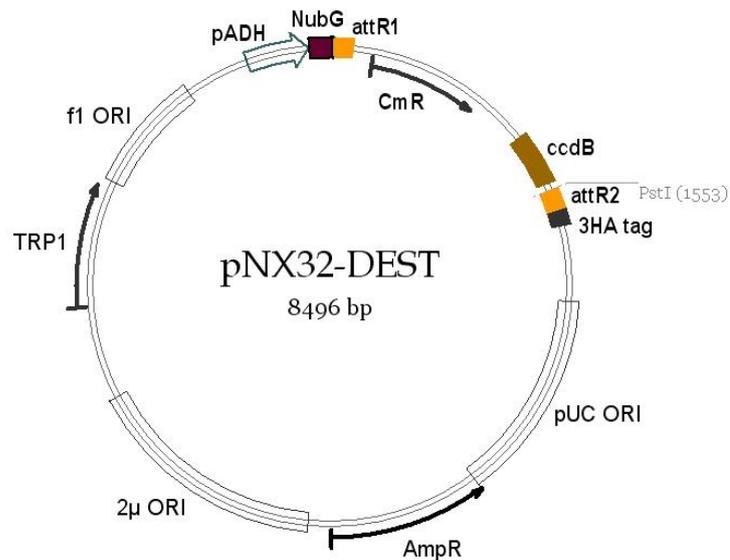
Dieser „low-copy“ Vektor wird im mating-based Split-Ubiquitin System verwendet, um das „bait“-Protein über „attachment sites“ (B1 / B2 Linker) mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins (Cub) und dem Transkriptionsfaktor (PLV) zu fusionieren. Diesem Fusionsprotein ist ein Methionin-regulierbarer Promotor (pMet25) vorgeschaltet. Eine Selektion kann in *E. coli* auf Ampicilin (Amp^R) erfolgen und in der Hefe durch mangelndes Leucin (LEU2) im Medium.

pNubWtXgate (Obrdlik *et al.*, 2004)

Dieser „high-copy“ Vektor wird im mating-based Split-Ubiquitin System verwendet, um das „prey“-Protein über „attachment sites“ (B1 / B2 Linker) mit der N-terminalen Hälfte des Wildtyp Ubiquitins (NubWt) zu fusionieren und dient als Kontrollvektor. Eine Selektion kann in *E. coli* auf Ampicilin (Amp^R) erfolgen und in der Hefe durch mangelndes Tryptophan (TRP1) im Medium.

pNXgate32-3HA (Obrdlik *et al.*, 2004)

Dieser „high-copy“ Vektor wird im mating-based Split-Ubiquitin System verwendet, um das „prey“-Protein über „attachment sites“ (B1 / B2 Linker) mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG) zu fusionieren. Eine Selektion kann in *E. coli* auf Ampicilin (Amp^R) erfolgen und in der Hefe durch mangelndes Tryptophan (TRP1) im Medium.

pNX32-DEST (Obrdlik *et al.*, 2004)

Dieser „high-copy“ Destinationvektor wird im mating-based Split-Ubiquitin System verwendet, um eine cDNA-Expressionsbank („prey“-Proteine) über „attachment sites“ (B1 / B2 Linker) mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (NubG) zu fusionieren. Eine Selektion kann in *E. coli* auf Ampicilin (Amp^R) erfolgen und in der Hefe durch mangelndes Tryptophan (TRP1) im Medium.

Anhang IV: Zusammensetzung „AHTLUM“-DropOut Powder1,5 g / Liter:

Arginin	0,90 g
Aspartat	3,00 g
Glutamat	3,00 g
Lysin	0,90 g
Phenylalanin	1,50 g
Serin	11,25 g
Threonin	6,00 g
Tyrosin	0,90 g
Valin	4,50 g
Alanin	1,20 g
Asparagin	1,20 g
Cystein	1,20 g
Glutamin	1,20 g
Glycin	1,20 g
Isoleucin	1,20 g
Prolin	1,20 g

Anhang V: Massenspektrometrisch ermittelte Peptide / Proteine

Die massenspektrometrische Proteinidentifizierung wurde von Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung; Halle, D) durchgeführt, ebenso wie die Analyse der erhaltenen Peptide mittels des Mascot Programms. Dabei galten immer folgende Suchparameter:

```
Type of search      : MS/MS Ion Search
Enzyme              : Trypsin
Variable modifications : Dioxidation (M),Gln->pyro-Glu (N-term Q),Glu->pyro-Glu (N-term E),Oxidation (HW),Oxidation (M)
Mass values         : Monoisotopic
Protein Mass        : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da
Fragment Mass Tolerance : ± 0.3 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type     : ESI-QUAD-TOF
```

Die Bedeutungen der aufgeführten Daten sind der Homepage des Programms zu entnehmen.

P34788 (At4G09800) 40S ribosomal protein S18

```
Q6LAE1_ARATH      Mass: 8808      Score: 157      Queries matched: 2
Mitochondrial ribosomal protein S13 (Fragment).- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).
 Check to include this hit in error tolerant search

Query  Observed  Mr(expt)  Mr(calc)  Delta Miss Score  Expect Rank Peptide
 22  799.4561  1596.8976  1596.8259  0.0717  0  90  2e-07  1  M.SLVANEEFQHILR.V + N-Acetyl (Protein)
 31  1051.0881  2100.1616  2100.0520  0.1096  0  67  3.8e-05  1  R.AGELSAAEIDNLMITIVANPR.Q + Oxidation (M)
```

P22953 (At5G02500) heat shock cognate 70 kDa protein 1

```
Q9LHA8_ARATH      Mass: 71057     Score: 115     Queries matched: 9
70 kDa heat shock protein (AT3g12580/T2E22_110) (Heat shock protein 70; 34105-36307).- Arabidopsis thaliana (Mou)
 Check to include this hit in error tolerant search

Query  Observed  Mr(expt)  Mr(calc)  Delta Miss Score  Expect Rank Peptide
 6  451.7726  901.5306  901.5233  0.0074  1  1  1.6e+02  1  R.NTTIPTKK.E
 18  555.2649  1108.5152  1108.5037  0.0116  0  8  35  1  R.YSDPSVQADK.S
 23  614.8240  1227.6334  1227.6207  0.0127  0  77  3.9e-06  1  R.VEIIANDQGNR.T
 25  624.3347  1246.6548  1246.6340  0.0209  0  11  16  1  K.DAGVISGLNVMR.I + Oxidation (M)
 34  687.8196  1373.6246  1373.6033  0.0213  0  36  0.055  1  K.NALENYAYNMR.N + Oxidation (M)
 37  718.8867  1435.7588  1435.7460  0.0129  0  8  33  1  K.VQQLLQDFNGK.E
 40  737.3593  1472.7040  1472.6783  0.0257  0  57  0.00038  1  R.TTPSYVAFTDSER.L
 44  830.4645  1658.9144  1658.8879  0.0266  0  14  8  1  R.IINEPTAAAIAYGLDK.K
 46  840.9374  1679.8602  1679.8267  0.0335  0  22  1.4  1  K.NAVVTVPAYFNDQR.Q
```

P92549 (ATMG01190) ATP synthase subunit α

ATPAM_ARATH Mass: 55011 Score: 398 Queries matched: 10

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (EC 3.6.3.14).- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 5	446.7621	891.5096	891.4814	0.0283	0	37	0.022	1	K.LELAQYR.E
<input checked="" type="checkbox"/> 13	513.8136	1025.6126	1025.5869	0.0257	0	45	0.0027	1	K.AVDSLVPVPIGR.G
<input checked="" type="checkbox"/> 15	522.3032	1042.5918	1042.5659	0.0260	0	55	0.00032	1	R.TGSIVDVPAGK.A
<input checked="" type="checkbox"/> 26	625.8396	1249.6646	1249.6302	0.0344	0	75	2.7e-06	1	R.AAELTNLFESR.I
<input checked="" type="checkbox"/> 33	642.3697	1282.7248	1282.6921	0.0327	0	62	4.2e-05	1	K.QPQYAPLPIEK.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 37	665.9015	1329.7884	1329.7504	0.0381	0	(7)	16	1	K.TTIAIDTILNQG.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 38	665.9046	1329.7946	1329.7504	0.0443	0	64	3.4e-05	1	K.TTIAIDTILNQG.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 62	546.3515	1636.0327	1635.9923	0.0404	0	114	2e-10	1	K.AILNSVKPELLQALK.G
<input checked="" type="checkbox"/> 78	1154.6190	2307.2234	2307.1495	0.0739	0	(77)	7.7e-07	1	R.EVAFAQFGSDLLDAATQALLNR.G
<input checked="" type="checkbox"/> 79	770.0820	2307.2242	2307.1495	0.0747	0	91	3e-08	1	R.EVAFAQFGSDLLDAATQALLNR.G

P94111 (At1G74020) strictosidine synthase 1

AAB40593 Mass: 35297 Score: 166 Queries matched: 6

ATU43713 NID: - Arabidopsis thaliana

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 3	406.2367	810.4588	810.4599	-0.0011	0	45	0.0064	1	K.LFVPETR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 42	657.3043	1312.5940	1312.5936	0.0005	0	73	1.2e-05	1	R.SGPEAFADSTGK.G
<input checked="" type="checkbox"/> 48	699.9459	1397.8772	1397.8646	0.0126	0	20	2.2	1	R.FSPIQVLIALLGLK.D
<input checked="" type="checkbox"/> 53	756.4269	1510.8392	1510.8355	0.0038	0	28	0.35	1	K.VNSNGEVLQTIPLK.D
<input checked="" type="checkbox"/> 61	585.6627	1753.9663	1753.9574	0.0089	1	45	0.0058	1	K.VNSNGEVLQTIPLKDK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 66	679.9930	2036.9572	2036.9399	0.0173	1	68	2.9e-05	1	K.AGSSEDFTNVSNPDNIKR.I

O82514 (At5G63400) adenylate kinase 1

AAK64049 Mass: 26915 Score: 90 Queries matched: 3

AY039945 NID: - Arabidopsis thaliana

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 13	544.2874	1086.5602	1086.5557	0.0046	0	13	11	1	K.APQEVTSVVK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 45	805.9464	1609.8782	1609.8312	0.0471	0	65	6.6e-05	1	K.TPGVDDITGEPLIQR.K
<input checked="" type="checkbox"/> 47	809.4589	1616.9032	1616.8410	0.0623	0	42	0.012	1	K.VLNFAIDDAILEER.I

O8LE12 (At4G12420) outer membrane lipoprotein-like

O8LE12_ARATH Mass: 20674 Score: 139 Queries matched: 3

Outer membrane lipoprotein-like.- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 17	555.7719	1109.5292	1109.5240	0.0052	0	56	0.00055	1	K.AVEEGYDISK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 22	623.2700	1244.5254	1244.5231	0.0024	0	62	0.00015	1	R.TAQMEETYSK.Q + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 55	950.9343	1899.8540	1899.8334	0.0207	0	64	7e-05	1	K.TPQSDTPESNTAPEDSK.G

Q1NZ06 (At4G24190) heat shock protein 90.7

Q1NZ06_ARATH Mass: 94091 Score: 352 Queries matched: 13
 Protein At4g24190.- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 30	536.3195	1070.6244	1070.5720	0.0525	0	46	0.0049	1	K.LGIIEDAANR.N
<input checked="" type="checkbox"/> 32	540.8185	1079.6224	1079.5863	0.0362	0	43	0.013	1	K.LTSLDQYIK.R
<input checked="" type="checkbox"/> 33	556.7932	1111.5718	1111.5298	0.0420	0	40	0.02	1	K.FEFQAEVSR.L
<input checked="" type="checkbox"/> 38	595.3063	1188.5980	1188.5510	0.0471	0	13	10	1	R.IASDPEDESVK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 43	630.8372	1259.6598	1259.5993	0.0605	0	53	0.0011	1	K.GNLASENVDDVK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 44	635.3058	1268.5970	1268.5408	0.0562	0	36	0.058	1	R.DEAGEYLEESK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 45	638.3538	1274.6930	1274.6354	0.0577	0	(24)	0.8	1	R.ELISNASDALDK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 46	638.3543	1274.6940	1274.6354	0.0587	0	74	8.1e-06	1	R.ELISNASDALDK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 51	676.3592	1350.7038	1350.6449	0.0589	0	87	4.9e-07	1	R.IMQSQTLSANK.Q + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 55	743.4288	1484.8430	1484.7835	0.0596	0	(71)	1.7e-05	1	K.GLVDSDTLPLNVS.R.E
<input checked="" type="checkbox"/> 56	743.4288	1484.8430	1484.7835	0.0596	0	73	1.1e-05	1	K.GLVDSDTLPLNVS.R.E
<input checked="" type="checkbox"/> 58	770.4454	1538.8762	1538.8014	0.0749	0	39	0.028	1	R.LMDIINSLSYLNK.D + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 59	776.4304	1550.8462	1550.7868	0.0594	0	48	0.0037	1	R.VFISDEFDELLPK.Y

P51818 (At5G56010) heat shock protein 90.3

AAL32910 Mass: 80002 Score: 758 Queries matched: 23
 AY062832 NID: - Arabidopsis thaliana

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 9	446.2129	890.4112	890.4174	-0.0062	0	18	3.6	1	K.FYEAFSK.N
<input checked="" type="checkbox"/> 11	475.2401	948.4656	948.4764	-0.0107	0	75	7e-06	1	K.SGDELTSK.D
<input checked="" type="checkbox"/> 13	501.7729	1001.5312	1001.5393	-0.0081	1	5	71	4	K.DVLGDKVEK.V
<input checked="" type="checkbox"/> 16	527.2671	1052.5196	1052.5179	0.0018	0	45	0.007	1	R.APFDFLDTK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 18	553.7587	1105.5028	1105.5139	-0.0110	1	4	1.1e+02	1	K.LDETEDEKK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 19	567.2898	1132.5650	1132.5764	-0.0114	0	(24)	0.84	1	K.AVENSPFEK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 20	567.2923	1132.5700	1132.5764	-0.0064	0	49	0.0032	1	K.AVENSPFEK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 21	584.7853	1167.5560	1167.5632	-0.0072	0	46	0.0055	1	K.LGIHEDSQNR.T
<input checked="" type="checkbox"/> 23	605.3132	1208.6118	1208.6190	-0.0071	1	38	0.033	1	K.RAPDFLDTK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 25	605.3201	1208.6256	1208.6190	0.0067	1	(22)	1.2	1	K.RAPDFLDTK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 28	628.8436	1255.6726	1255.6884	-0.0158	0	70	2.1e-05	1	K.ADLVNNLGTIAR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 30	646.3132	1290.6118	1290.6303	-0.0184	0	83	1.2e-06	1	R.ELISNSSDALDK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 31	646.3197	1290.6248	1290.6303	-0.0054	0	(16)	5.3	1	R.ELISNSSDALDK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 32	646.3201	1290.6256	1290.6303	-0.0046	0	(14)	9.8	1	R.ELISNSSDALDK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 33	646.3208	1290.6270	1290.6303	-0.0032	0	(8)	32	2	R.ELISNSSDALDK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 39	764.3988	1526.7830	1526.7940	-0.0110	0	100	2.3e-08	1	K.GIVDSEDLPLNISR.E
<input checked="" type="checkbox"/> 40	800.8760	1599.7374	1599.7417	-0.0042	0	61	0.00018	1	K.EGQNDIFYITGESK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 43	847.9344	1693.8542	1693.8557	-0.0014	0	75	6.9e-06	1	K.TNNTLTIIDSGIGMTK.A + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 45	578.9846	1733.9320	1733.9352	-0.0032	0	58	0.00031	1	K.LDGQPELFIHIIPDK.T
<input checked="" type="checkbox"/> 46	867.9825	1733.9504	1733.9352	0.0152	0	(12)	13	1	K.LDGQPELFIHIIPDK.T
<input checked="" type="checkbox"/> 48	651.3027	1950.8863	1950.9026	-0.0164	1	(20)	2.1	1	K.KTMEINPENSIMDEL.R.K + 2 Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 49	976.4609	1950.9072	1950.9026	0.0046	1	30	0.2	1	K.KTMEINPENSIMDEL.R.K + 2 Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 51	985.8860	2954.6362	2954.5277	0.1085	0	6	36	1	K.DLVLLLFETALLTSGFSLDEPNTFGSR.I

Q8GTY0 (At5G60390) elongation factor 1-alpha

Q8GTY0_ARATH Mass: 49519 Score: 416 Queries matched: 13

Putative translation elongation factor eEF-1 alpha chain (Gene A4).- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 6	457.7821	913.5496	913.5597	-0.0100	0	48	0.0035	1	R.QTVAVGVK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 7	457.7832	913.5518	913.5597	-0.0078	0	(19)	2.7	1	R.QTVAVGVK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 11	488.2714	974.5282	974.5437	-0.0154	0	51	0.0016	1	R.LPLQDVYK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 12	504.2774	1006.5402	1006.5447	-0.0045	1	22	1.4	2	K.ARYDEIIK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 15	513.3008	1024.5870	1024.6030	-0.0159	0	(50)	0.0018	1	K.IGGIGTVFVGR.V
<input checked="" type="checkbox"/> 16	513.3044	1024.5942	1024.6030	-0.0087	0	67	3.9e-05	1	K.IGGIGTVFVGR.V
<input checked="" type="checkbox"/> 17	513.3055	1024.5964	1024.6030	-0.0065	0	(64)	8.2e-05	1	K.IGGIGTVFVGR.V
<input checked="" type="checkbox"/> 18	513.3115	1024.6084	1024.6030	0.0055	0	(32)	0.12	1	K.IGGIGTVFVGR.V
<input checked="" type="checkbox"/> 19	513.7456	1025.4766	1025.4818	-0.0051	0	29	0.25	1	R.STNLDWYK.G
<input checked="" type="checkbox"/> 20	513.7456	1025.4766	1025.4818	-0.0051	0	(28)	0.34	1	R.STNLDWYK.G
<input checked="" type="checkbox"/> 25	560.7964	1119.5782	1119.5924	-0.0142	0	63	0.00012	1	K.STTTGHLIYK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 46	771.3841	2311.1305	2311.1228	0.0076	0	57	0.00036	1	K.MTPTKPMVVETTFSEYPLGR.F + 2 Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 47	846.7772	2537.3098	2537.3121	-0.0024	0	82	1.1e-06	1	R.VETGMIKPGMVVTFAPTGLTTEVK.S + 2 Oxidation (M)

P20363 (At5G19780) tubulin alpha-5 chain

A32712 Mass: 49622 Score: 180 Queries matched: 4

tubulin alpha-5 chain - Arabidopsis thaliana

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 5	452.2159	902.4172	902.4208	-0.0035	0	27	0.41	1	K.FDLMYAK.R + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 31	698.8845	1395.7544	1395.7510	0.0034	0	60	0.0002	1	R.QLFHPEQLISGK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 33	766.4551	1530.8956	1530.8981	-0.0024	0	18	3.7	1	R.LISQIISLTSR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 39	851.4570	1700.8994	1700.8985	0.0009	0	77	3.5e-06	1	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T

P53492 (At5G09810) actin 7

S68107 Mass: 41709 Score: 399 Queries matched: 10

actin 7 - Arabidopsis thaliana

 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 8	488.7321	975.4496	975.4410	0.0086	0	51	0.0019	1	K.AGFAGDDAPR.A
<input checked="" type="checkbox"/> 13	574.3087	1146.6028	1146.5954	0.0074	0	(25)	0.68	1	K.EITALAPSSMK.I
<input checked="" type="checkbox"/> 17	582.3061	1162.5976	1162.5903	0.0073	0	38	0.034	1	K.EITALAPSSMK.I + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 18	588.7827	1175.5508	1175.5427	0.0081	0	30	0.22	1	R.HTGVMVGMGQK.D + 2 Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 19	591.7706	1181.5266	1181.5200	0.0066	0	55	0.00064	1	K.DAYVGDEAQS.K
<input checked="" type="checkbox"/> 20	596.7734	1191.5322	1191.5230	0.0092	0	39	0.029	1	R.GYMFTTAER.E + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 21	596.7738	1191.5330	1191.5230	0.0100	0	(8)	37	2	R.GYMFTTAER.E + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 38	887.9597	1773.9048	1773.8897	0.0151	0	124	8e-11	1	K.NYELPDGQVITIGAER.F
<input checked="" type="checkbox"/> 41	928.4826	1854.9506	1854.9251	0.0256	0	28	0.28	1	K.LAYVALDYEQLETAK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 44	652.0286	1953.0640	1953.0571	0.0069	0	39	0.025	1	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A

Q9C5U3 (At5G19990) 26S proteasome AAA-ATPase subunit

Q9C5U3_ARATH Mass: 47218 Score: 118 Queries matched: 3
AtSUG1 protein (At5g19990) (Hypothetical protein).- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
✓ 16	579.8318	1157.6490	1157.6445	0.0046	0	15	7.1	1	K.GVLLYGPPGTGK.T
✓ 29	666.3205	1330.6264	1330.6153	0.0111	0	13	10	1	K.IEFPNPNEESR.F
✓ 34	734.8091	1467.6036	1467.5896	0.0140	0	91	1.6e-07	1	R.MESGSGNGDSEVQR.T + Oxidation (M)

Q9FX54 (At1G13440) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2

Q9FX54_ARATH Mass: 36890 Score: 1426 Queries matched: 41
Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (At1g13440/F13B4_8).- Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress).

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
✓ 3	400.7290	799.4434	799.4803	-0.0369	0	74	7.6e-06	1	K.VVISAPSK.D
✓ 7	414.1790	826.3434	826.4007	-0.0573	0	46	0.0041	1	K.LTGMSFR.V + Oxidation (M)
✓ 8	414.2321	826.4496	826.4912	-0.0416	0	(24)	0.8	1	K.VLPSLNGK.L
✓ 9	414.2384	826.4622	826.4912	-0.0290	0	24	0.67	1	K.VLPSLNGK.L
✓ 10	417.2185	832.4224	832.4555	-0.0331	0	56	0.00053	1	R.IGINGFGR.I
✓ 14	422.2041	842.3936	842.3956	-0.0020	0	(26)	0.54	1	K.LTGMSFR.V + Dioxidation (M)
✓ 15	425.7046	849.3946	849.3902	0.0044	0	1	2.1e+02	3	K.TVDGPSMK.D + Oxidation (M)
✓ 20	495.7591	989.5036	989.5029	0.0007	1	51	0.0019	1	K.AIKEESEGK.M
✓ 22	560.2654	1118.5162	1118.5145	0.0017	0	40	0.019	1	K.YDSVHGQWK.H
✓ 23	570.8237	1139.6328	1139.6373	-0.0044	0	(51)	0.0015	1	R.VVDLIVHMSK.A
✓ 24	578.8084	1155.6022	1155.6322	-0.0299	0	(52)	0.0013	1	R.VVDLIVHMSK.A + Oxidation (M)
✓ 25	578.8204	1155.6262	1155.6322	-0.0059	0	(51)	0.0017	1	R.VVDLIVHMSK.A + Oxidation (M)
✓ 26	578.8215	1155.6284	1155.6322	-0.0037	0	56	0.00054	1	R.VVDLIVHMSK.A + Oxidation (M)
✓ 27	578.8358	1155.6570	1155.6322	0.0249	0	(16)	5.4	1	R.VVDLIVHMSK.A + Oxidation (M)
✓ 30	586.8190	1171.6234	1171.6271	-0.0036	0	(46)	0.0046	1	R.VVDLIVHMSK.A + Dioxidation (M)
✓ 32	594.8171	1187.6196	1187.6220	-0.0024	0	(41)	0.017	1	R.VVDLIVHMSK.A + Dioxidation (M); Oxida
✓ 35	717.8087	1433.6028	1433.7514	-0.1486	0	58	0.00031	1	R.AASFNIIPSSSTGAAK.A
✓ 36	717.8509	1433.6872	1433.7514	-0.0642	0	(38)	0.036	1	R.AASFNIIPSSSTGAAK.A
✓ 37	717.8867	1433.7588	1433.7514	0.0074	0	(7)	39	1	R.AASFNIIPSSSTGAAK.A
✓ 38	717.8880	1433.7614	1433.7514	0.0100	0	(8)	39	1	R.AASFNIIPSSSTGAAK.A
✓ 40	749.8644	1497.7142	1497.8403	-0.1261	0	101	1.4e-08	1	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 41	749.9272	1497.8398	1497.8403	-0.0005	0	(52)	0.0014	1	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 42	749.9310	1497.8474	1497.8403	0.0071	0	(92)	1.2e-07	1	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 43	749.9317	1497.8488	1497.8403	0.0085	0	(85)	5.9e-07	1	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 44	749.9340	1497.8534	1497.8403	0.0131	0	(33)	0.11	1	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 45	749.9344	1497.8542	1497.8403	0.0139	0	(29)	0.25	1	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 46	749.9363	1497.8580	1497.8403	0.0177	0	(2)	1.1e+02	3	R.VPTVDVSVVDLTVR.L
✓ 49	559.6577	1675.9513	1675.9661	-0.0149	0	97	3.9e-08	1	K.TLLFGEKEPVTVFGIR.N
✓ 52	578.9444	1733.8114	1733.8083	0.0031	0	(49)	0.0025	1	K.DAPMFVVGVEHEYK.S
✓ 53	867.9136	1733.8126	1733.8083	0.0043	0	(82)	1.2e-06	1	K.DAPMFVVGVEHEYK.S
✓ 54	875.8777	1749.7408	1749.8032	-0.0624	0	92	1.2e-07	1	K.DAPMFVVGVEHEYK.S + Oxidation (M)
✓ 55	584.2582	1749.7528	1749.8032	-0.0505	0	(74)	8.8e-06	1	K.DAPMFVVGVEHEYK.S + Oxidation (M)
✓ 56	881.3915	1760.7684	1760.7794	-0.0110	0	91	1.9e-07	1	K.LVSWYDNEWGYSSR.V
✓ 59	678.3655	2032.0747	2032.0663	0.0083	0	(97)	3.9e-08	1	R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T
✓ 60	683.6624	2047.9654	2048.0612	-0.0959	0	139	2.2e-12	1	R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T + Oxidation (M)
✓ 61	683.6982	2048.0728	2048.0612	0.0115	0	(7)	41	1	R.FGIVEGLMTTVHSITATQK.T + Oxidation (M)
✓ 64	1086.4427	2170.8708	2171.0019	-0.1310	0	129	2.1e-11	1	K.GILGYTEDDVVSTDFVGDNR.S

✓	65	1086.5181	2171.0216	2171.0019	0.0198	0	(54)	0.00072	1	K.GILGYTEDDVVSTDFVGDNR.S
✓	66	1086.5188	2171.0230	2171.0019	0.0212	0	(10)	20	1	K.GILGYTEDDVVSTDFVGDNR.S
✓	68	975.1306	2922.3700	2922.3560	0.0140	1	155	5.9e-14	1	R.NPEDIPWGEAGADFVVESTGVFTDKDK.A
✓	69	980.4601	2938.3585	2938.3509	0.0076	1	(141)	1.4e-12	1	R.NPEDIPWGEAGADFVVESTGVFTDKDK.A + Oxida

Anhang VI: Abschätzung zur Vollständigkeit der Erfassung aller möglichen $G\alpha$ -Bindepartner in den cDNA-Expressionsbanken

	gewachsen	unique	mehrfach	mehrfach in %
Suche mit $G\alpha$ (A.t.)				
in der cDNA von <i>Arabidopsis</i>				
1. Versuch	15	10	5	33,33
2. Versuch	17	14	3	17,65
3. Versuch	7	4	3	42,86
4. Versuch	6	5	1	16,67
5. Versuch	22	15	7	31,82
gesamt	67	48	19	
Suche mit $G\alpha$ (E.c.)				
in der cDNA von <i>Arabidopsis</i>				
1. Versuch	25	16	9	36,00
2. Versuch	17	10	7	41,18
3. Versuch	14	9	5	35,71
4. Versuch	10	7	3	30,00
5. Versuch	18	11	7	38,89
gesamt	84	53	31	
Suche mit $G\alpha$ (E.c.)				
in der cDNA von <i>Eschscholzia</i>				
1. Versuch	11	9	2	18,18
2. Versuch	9	8	1	11,11
3. Versuch	6	5	1	16,67
4. Versuch	9	9	0	0,00
5. Versuch	8	6	2	25,00
gesamt	43	37	6	

Aufgelistet sind alle aufgetretenen Interaktionsklone geordnet nach Versuchsansatz und Versuch (1. – 5.). Diese sind unterteilt in die Gesamtzahl (gewachsen), die einmal aufgetretenen (unique) und die mehrfach aufgetreten. Aus der Zahl der Mehrfach-Funde, bezogen auf die Anzahl der insgesamt aufgetretenen Klone wurde die Vollständigkeit in Prozent errechnet (mehrfach in %).

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-Sulfonsäure
Ade	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AGB1	GTP binding protein beta 1
AGG1	GTP binding protein gamma 1
AGG2	GTP binding protein gamma 2
AK	Antikörper
Amp ^R	Resistenz gegen Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASP	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
att	attachment site
best.	bestimmt
bidest.	bidestilliert
bis-BODIPY FL C ₁₁ -PC	1, 2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-undecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
<i>ccdB</i>	Gen im <i>ccd</i> (control of cell death)-Locus
cDNA	komplementäre DNA
CEN	Centromer
cfu	colony forming unit
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Cm ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
Cub	C-terminale Hälfte des Ubiquitins
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DEST	destination
DNA	Dexoyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithioerythrit

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. californica</i>	<i>Eschscolzia californica</i>
<i>E.c.</i>	<i>Eschscolzia californica</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequenced tag
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (latein, und andere)
etc.	et cetera (latein, und so weiter)
EtOH	Ethanol
GDP	Guanosindiphosphat
GPA1	GTP binding protein alpha 1
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GCR1	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 1
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hemagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
His	Histidin
HRP	horse radish peroxidase
IP ₃	Inosit-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Resistenz gegen Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
lacZ	codiert für das Enzym β-Galactosidase
LB	Luria-Bertani Medium
LEU	Leucin
MAT	mating type
mbSUS	mating-based Split-Ubiquitin System
Met	Methionin
MOPS	3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Na	Natrium
Ni	Nickel
NubG	N-terminale Hälfte des Ubiquitins, mutierte Form
NubWt	N-terminale Hälfte des Ubiquitins, Wildtyp

OD _{nm}	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge (nm)
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel–Elektrophorese
PCR	Polymerase–Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>P.h.</i>	<i>Petunia hybrida</i>
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLV	Protein A–lexA–VP16
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scFv	single chain variable fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec ^R	Resistenz gegen Spectinomycin
SSP Consortium	Salk/Stanford/PGEC Consortium
Tab.	Tabelle
TAE	Tris–Acetat–EDTA
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TE	Tris–EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TM	Transmembran–Domäne
Tris	2–Amino–2 (hydroxymethyl)–1,3–propandiol
TRP	Tryptophan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität; µmol Substratumsatz pro Minute)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteile pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtsanteile pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
X–Gal	5–Bromo–4–Chloro–3–Indolyl–β–D–Galactopyranosid

Desweiteren wurden die üblichen Abkürzungen des “Internationalen Einheitssystems” (Système international d’Unités, SI) verwendet.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Heterotrimere G-Proteine (Ullah <i>et al.</i> , 2003)	12
Abb. 2: Schematische Darstellung des G-Protein Signalzyklus (Temple und Jones, 2007)	14
Abb. 3: Phospholipidstruktur und dessen Spaltstellen von PLD, PLC, PLA ₁ , PLA ₂ und Acylhydrolasen (Wang, 2004)	19
Abb. 4: Schematische Darstellung des Ubiquitins (Zech <i>et al.</i> , 2005)	23
Abb. 5: Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> Klonierung mit anschließendem Mating	24
Abb. 6: Schematische Darstellung einer Interaktion und deren Detektion	25
Abb. 7: Verwendeter Längenstandard SmartLadder	37
Abb. 8: Schematische Darstellung der Gateway Technologie	41
Abb. 9: Längenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder	55
Abb. 10: PLA ₂ -Aktivität in der Plasmamembran von <i>Eschscholzia</i> und <i>Arabidopsis</i>	66
Abb. 11: PLA ₂ -Aktivität der Plasmamembran von <i>Arabidopsis</i> nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten	66
Abb. 12: Immunologischer Nachweis des <i>Arabidopsis</i> G α -Proteins	67
Abb. 13: PLA ₂ -Aktivität des Co-Immunpräzipitats ist mit GTP γ S stimulierbar	68
Abb. 14: PLA ₂ -Aktivität der Plasmamembran nach Inkubation mit G α Antikörper	69
Abb. 15: Proteinfärbung co-präzipitierter Plasmamembranproteine	71
Abb. 16: Proteinfärbung und Immundetektion co-präzipitierter löslicher Proteine	71
Abb. 17: Interaktion von G α und den Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins	74
Abb. 18: Suche nach Bindungspartnern von G α (<i>Eschscholzia</i>) innerhalb der <i>Arabidopsis</i> -Proteine	75
Abb. 19: Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion von G α (<i>Eschscholzia</i>)-Bindepartner innerhalb der <i>Arabidopsis</i> -Proteine	77
Abb. 20: Änderung der Wachstumsrate von Kolonien, welche mit G α (<i>Eschscholzia</i>) interagierende Proteine exprimieren	78
Abb. 21: Interaktoren aus der cDNA-Expressionsbank (<i>Arabidopsis</i>) wurden erneut auf Interaktion mit G α getestet	81
Abb. 22: Volllänge-cDNAs der Interaktoren aus der cDNA-Expressionsbank (<i>Arabidopsis</i>) wurden erneut auf Interaktion mit G α getestet	82
Abb. 23: Methionin-Zusatz reduziert die Konzentration an verfügbarem G α -Protein	86
Abb. 24: Abschätzung zur Vollständigkeit der Erfassung aller möglichen G α -Bindepartner in den cDNA-Expressionsbanken	86
Abb. 25: Wachstumstest zur Quantifizierung der Interaktion bei hoher Stringenz gefundener G α (<i>Eschscholzia</i>)-Bindungspartner innerhalb der <i>Arabidopsis</i> -Proteine	87

Abb. 26: Änderung der Wachstumsrate von Kolonien, welche mit $G\alpha$ interagierende Proteine bei hoher Stringenz exprimieren	94
Abb. 27: Einteilung aller mit dem mating-based Split-Ubiquitin Systems identifizierten $G\alpha$ -Bindepertner in Funktionskategorien (TAIR-Datenbank)	95
Abb. 28: Aminosäuresequenzvergleich potentieller A_2 -Phospholipasen	96
Abb. 29: Interaktion von $G\alpha$ und potentiellen PLA_2 -Proteinen	98
Abb. 30: Interaktion von PhPatatin1 und den Untereinheiten des G-Proteins	98
Abb. 31: Aminosäuresequenzvergleich der $G\alpha$ -Proteine von <i>Eschscholzia</i> und <i>Arabidopsis</i>	104

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Überblick wichtiger Plasmamembran-Rezeptoren	10
Tab. 2: Funktionen heterotrimerer G-Proteine in Pflanzen (Übersicht)	15
Tab. 3: Geräte	27
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien	28
Tab. 5: Kitsysteme	29
Tab. 6: Verwendete Enzyme, Polymerasen	29
Tab. 7: DNA-Fragmente	30
Tab. 8: Oligonukleotide	30
Tab. 9: Verwendete Plasmide	31
Tab. 10: Verwendete Antikörper	32
Tab. 11: <i>Escherichia coli</i> -Stämme	32
Tab. 12: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	33
Tab. 13: Pipettierschema für PCR-Reaktionen	35
Tab. 14: Zusammensetzung eines 36 g Systems	52
Tab. 15: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel	55
Tab. 16: Massenspektrometrisch identifizierte, mit $G\alpha$ co-präzipitierende Proteine	72
Tab. 17: Mit $G\alpha$ (<i>Eschscholzia</i>) interagierende <i>Arabidopsis</i> -Proteine, nach absteigender Bindungsstärke sortiert	79
Tab. 18: Mit $G\alpha$ (<i>Eschscholzia</i>) interagierende <i>Arabidopsis</i> -Proteine	87
Tab. 19: Mit $G\alpha$ (<i>Arabidopsis</i>) interagierende <i>Arabidopsis</i> -Proteine	89
Tab. 20: Mit $G\alpha$ (<i>Eschscholzia</i>) interagierende <i>Eschscholzia</i> -Proteine	90
Tab. 21: Mit $G\alpha$ interagierende Proteine, deren Bindungsstärke nicht quantifizierbar war	92
Tab. 22: Proteine, die sowohl $G\alpha$ von <i>Eschscholzia</i> als auch von <i>Arabidopsis</i> binden	93
Tab. 23: Mit $G\alpha$ interagierende Transkriptionsfaktoren	102

ANHANGVERZEICHNIS

Anhang I:	Aminosäuresequenzvergleich pflanzlicher G α -Proteine	107
Anhang II:	DNA-Sequenzen	108
Anhang III:	Vektorkarten	109
Anhang IV:	Zusammensetzung „AHTLUM“-DropOut Powder	111
Anhang V:	Massenspektrometrisch ermittelte Peptide / Proteine	112
Anhang VI:	Abschätzung zur Vollständigkeit der Erfassung aller möglichen G α -Bindepartner in den cDNA-Expressionsbanken	117

LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. Watson, D. 1995. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.
- Alonso, R., L. Onate-Sanchez, F. Weltmeier, A. Ehlert, I. Diaz, K. Dietrich, J. Vicente-Carbajosa, and W. Droge-Laser. 2009. A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell* **21**: 1747-61.
- Ando, S., S. Takumi, Y. Ueda, T. Ueda, N. Mori, and C. Nakamura. 2000. Nicotiana tabacum cDNAs encoding alpha and beta subunits of a heterotrimeric GTP-binding protein isolated from hairy root tissues. *Genes & Genetic Systems* **75**: 211-21.
- Apone, F., N. Alyeshmerni, K. Wiens, D. Chalmers, M.J. Chrispeels, and G. Colucci. 2003. The G-protein-coupled receptor GCR1 regulates DNA synthesis through activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Plant Physiology* **133**: 571-9.
- Balsinde, J. and M.A. Balboa. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cellular Signalling* **17**: 1052-62.
- Beffa, R., M. Szell, P. Meuwly, A. Pay, R. Vogeli-Lange, J.P. Mettraux, G. Neuhaus, F. Meins, Jr., and F. Nagy. 1995. Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO Journal* **14**: 5753-61.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-23.
- Blechert, S., W. Brodschelm, S. Holder, L. Kammerer, T.M. Kutchan, M.J. Mueller, Z.Q. Xia, and M.H. Zenk. 1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 4099-105.
- Carlson, J.E., J.H. Leebens-Mack, P.K. Wall, L.M. Zahn, L.A. Mueller, L.L. Landherr, Y. Hu, D.C. Ilut, J.M. Arrington, S. Choirean, A. Becker, D. Field, S.D. Tanksley, H. Ma, and C.W. dePamphilis. 2006. EST database for early flower development in California poppy (*Eschscholzia californica* Cham., Papaveraceae) tags over 6,000 genes from a basal eudicot. *Plant Molecular Biology* **62**: 351-69.
- Chan, A., D. Puiu, A. Melake, J. Orvis, Q. Zhao, J. Wortman, T. Utterback, M.J. Rosovitz, J.M. Inman, P. Amedeo, S. Schobel, K. Galinsky, C. Fraser, J. Ravel, and P. Rabinowicz. 2008. GTP-binding protein (P) alpha subunit, gpa1, putative. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Chen, J.G. 2008. Heterotrimeric G-protein signaling in Arabidopsis: Puzzling G-protein-coupled receptor. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 1042-5.

- Chen, J.G., Y. Gao, and A.M. Jones. 2006. Differential roles of Arabidopsis heterotrimeric G-protein subunits in modulating cell division in roots. *Plant Physiology* **141**: 887-97.
- Chen, Y.L., R. Huang, Y.M. Xiao, P. Lu, J. Chen, and X.C. Wang. 2004. Extracellular calmodulin-induced stomatal closure is mediated by heterotrimeric G protein and H₂O₂. *Plant Physiology* **136**: 4096-103.
- Dhondt, S., G. Gouzerh, A. Muller, M. Legrand, and T. Heitz. 2002. Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. *Plant Journal* **32**: 749-62.
- Dordschbal, B. 2002. Aktivität und Regulation von Phospholipase A₂ in der Plasmamembran von *Eschscholzia californica*. *MLU Halle-Wittenberg*.
- Fan, L.M., W. Zhang, J.G. Chen, J.P. Taylor, A.M. Jones, and S.M. Assmann. 2008. Abscisic acid regulation of guard-cell K⁺ and anion channels in Gbeta- and RGS-deficient Arabidopsis lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8476-81.
- Fogel, G.B. and C.F. Brunk. 1998. Temperature gradient chamber for relative growth rate analysis of yeast. *Analytical Biochemistry* **260**: 80-4.
- Fujisawa, Y., T. Kato, S. Ohki, A. Ishikawa, H. Kitano, T. Sasaki, T. Asahi, and Y. Iwasaki. 1999. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 7575-80.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**: 151-158.
- Gao, Y., S. Wang, T. Asami, and J.G. Chen. 2008. Loss-of-function mutations in the Arabidopsis heterotrimeric G-protein alpha subunit enhance the developmental defects of brassinosteroid signaling and biosynthesis mutants. *Plant and Cell Physiology* **49**: 1013-24.
- Garritsen, A., P.J. van Galen, and W.F. Simonds. 1993. The N-terminal coiled-coil domain of beta is essential for gamma association: a model for G-protein beta gamma subunit interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 7706-10.
- Gilman, A.G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry* **56**: 615-49.
- Gookin, T.E., J. Kim, and S.M. Assmann. 2008. Whole proteome identification of plant candidate G-protein coupled receptors in Arabidopsis, rice, and poplar: computational prediction and in-vivo protein coupling. *Genome Biology* **9**: R120.
- Grefen, C., P. Obrdlik, and K. Harter. 2009. The determination of protein-protein interactions by the mating-based split-ubiquitin system (mbSUS). *Methods in Molecular Biology* **479**: 217-33.
- Hamm, H.E. 1998. The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 669-72.

- Hartley, J.L., G.F. Temple, and M.A. Brasch. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**: 1788-95.
- Heinze, M., J. Steighardt, A. Gesell, W. Schwartz, and W. Roos. 2007. Regulatory interaction of the Galpha protein with phospholipase A₂ in the plasma membrane of *Eschscholzia californica*. *Plant Journal* **52**: 1041-51.
- Holk, A., S. Rietz, M. Zahn, H. Quader, and G.F. Scherer. 2002. Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiology* **130**: 90-101.
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- http://pgn.cornell.edu/blast/blast_search.pl.
- <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>.
- <http://www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp>.
- <http://www.clcbio.com/>.
- <http://www.lifetech.com/gateway>.
- <http://www.matrixscience.com>.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>.
- Ishikawa, A., H. Tsubouchi, Y. Iwasaki, and T. Asahi. 1995. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the alpha subunit of a G protein from *rice*. *Plant Cell Physiology* **36**: 353-9.
- Johnsson, N. and A. Varshavsky. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 10340-4.
- Jones, A.M. 2002. G-protein-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 402-7.
- Jones, A.M. and S.M. Assmann. 2004. Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Reports* **5**: 572-8.
- Joo, J.H., S. Wang, J.G. Chen, A.M. Jones, and N.V. Fedoroff. 2005. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* **17**: 957-70.
- Kaiser, C., S. Michaelis, and A. Mitchell. 1994. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Kato, C., T. Mizutani, H. Tamaki, H. Kumagai, T. Kamiya, A. Hirobe, Y. Fujisawa, H. Kato, and Y. Iwasaki. 2004. Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane. *Plant Journal* **38**: 320-31.
- Kutsnetsov, V.V. and R. Oelmueller. 1996. Isolation of cDNAs encoding the subunit alpha of heterotrimeric G proteins from *Lupinus luteus*. *Plant Gene Register*.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lapik, Y.R. and L.S. Kaufman. 2003. The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* **15**: 1578-90.
- Lease, K.A., J. Wen, J. Li, J.T. Doke, E. Liscum, and J.C. Walker. 2001. A mutant Arabidopsis heterotrimeric G-protein beta subunit affects leaf, flower, and fruit development. *Plant Cell* **13**: 2631-41.
- Lee, H.Y., S.C. Bahn, Y.M. Kang, K.H. Lee, H.J. Kim, E.K. Noh, J.P. Palta, J.S. Shin, and S.B. Ryu. 2003. Secretory low molecular weight phospholipase A₂ plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 1990-2002.
- Lee, H.Y., S.C. Bahn, J.S. Shin, I. Hwang, K. Back, J.H. Doelling, and S.B. Ryu. 2005. Multiple forms of secretory phospholipase A₂ in plants. *Progress in Lipid Research* **44**: 52-67.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **18**: 100-127.
- Lodish, H., A. Berk, L.S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J.E. Darnell. 2001. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ma, H., M.F. Yanofsky, and E.M. Meyerowitz. 1990. Molecular cloning and characterization of GPA1, a G protein alpha subunit gene from Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 3821-5.
- Mansfeld, J. 2009. Plant phospholipases A₂: perspectives on biotechnological applications. *Biotechnology Letters* **31**: 1373-80.
- Marsh, J.F., 3rd and L.S. Kaufman. 1999. Cloning and characterisation of PGA1 and PGA2: two G protein alpha-subunits from pea that promote growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Journal* **19**: 237-47.
- Memelink, J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* **70**: 1560-70.
- Millner, P.A. 2001. Heterotrimeric G-proteins in plant cell signaling. *New Phytologist* **151**: 165-174.
- Narvaez-Vasquez, J., J. Florin-Christensen, and C.A. Ryan. 1999. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**: 2249-60.
- Neer, E.J., C.J. Schmidt, R. Nambudripad, and T.F. Smith. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**: 297-300.
- Nilson, S.E. and S.M. Assmann. 2010. The alpha-subunit of the Arabidopsis heterotrimeric G protein, GPA1, is a regulator of transpiration efficiency. *Plant Physiology* **152**: 2067-77.

- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock, and R. Treisman. 1988. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**: 989-1003.
- Obrdlik, P., M. El-Bakkoury, T. Hamacher, C. Cappellaro, C. Vilarino, C. Fleischer, H. Ellerbrok, R. Kamuzinzi, V. Ledent, D. Blaudez, D. Sanders, J.L. Revuelta, E. Boles, B. Andre, and W.B. Frommer. 2004. K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 12242-7.
- Okamoto, H., M. Matsui, and X.W. Deng. 2001. Overexpression of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1639-52.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-45.
- Palmgren, M.G. and M. Sommarin. 1989. Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiology* **90**: 1009-14.
- Pan, S., E. Czarnecka-Verner, and W.B. Gurley. 2000. Role of the TATA binding protein-transcription factor IIB interaction in supporting basal and activated transcription in plant cells. *Plant Cell* **12**: 125-36.
- Pandey, S. and S.M. Assmann. 2004. The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* **16**: 1616-32.
- Passmore, S., G.T. Maine, R. Elble, C. Christ, and B.K. Tye. 1988. Saccharomyces cerevisiae protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT alpha cells. *Journal of Molecular Biology* **204**: 593-606.
- Paul, R., A. Holk, and G.F.E. Scherer. 1998. Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action: rapid activation of phospholipase A₂ activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant Journal* **16**: 601-611.
- Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**: 639-50.
- Poulsen, C., X.M. Mai, and S. Borg. 1994. A Lotus japonicus cDNA encoding an alpha subunit of a heterotrimeric G-protein. *Plant Physiology* **105**: 1453-4.
- Provart, N.J., H. Ma, L. Willmitzer, and B. Mueller-Roeber. 1995. GPA1_SOLTU. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Rajasekhar, V.K., C. Lamb, and R.A. Dixon. 1999. Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent pseudomonas syringae pv glycinea. *Plant Physiology* **120**: 1137-46.

- Roos, W., B. Dordschbal, J. Steighardt, M. Hieke, D. Weiss, and G. Saalbach. 1999. A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1448**: 390-402.
- Roos, W., K. Viehweger, B. Dordschbal, B. Schumann, S. Evers, J. Steighardt, and W. Schwartze. 2006. Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways: the case of *Eschscholtzia californica*. *Journal of Plant Physiology* **163**: 369-81.
- Rounsley, S.D., G.S. Ditta, and M.F. Yanofsky. 1995. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **7**: 1259-69.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Schaloske, R.H. and E.A. Dennis. 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta* **1761**: 1246-59.
- Scherer, G.F.E. 2010. Phospholipase A in Plant Signal Transduction. In *Lipid Signaling in Plants* (ed. T. Munnik), pp. 3-22. Plant Cell Monographs, Springer, Heidelberg.
- Schiestl, R.H. and R.D. Gietz. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* **16**: 339-46.
- Schmitz-Linneweber, C. and I. Small. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science* **13**: 663-70.
- Schwartze, W. 2007. Die zelluläre Kontrolle der PLA₂-Aktivität – ein Element des Signaltransfers zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in *Eschscholtzia californica*. *MLU Halle-Wittenberg*.
- Seo, P.J., M.J. Kim, J.Y. Park, S.Y. Kim, J. Jeon, Y.H. Lee, J. Kim, and C.M. Park. 2010. Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **61**: 661-71.
- Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-8.
- Stagljar, I., C. Korostensky, N. Johnsson, and S. te Heesen. 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 5187-92.
- Suharsono, U., Y. Fujisawa, T. Kawasaki, Y. Iwasaki, H. Satoh, and K. Shimamoto. 2002. The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 13307-12.
- Temple, B.R. and A.M. Jones. 2007. The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 249-66.

- Touhara, K. and S. Hosokawa. 2005. Molecular cloning of genes encoding two G protein alpha subunits from lima bean. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*.
- Tuteja, N. and S.K. Sopory. 2008. Plant signaling in stress: G-protein coupled receptors, heterotrimeric G-proteins and signal coupling via phospholipases. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 79-86.
- Ugolini, S. and C.V. Bruschi. 1996. The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8-18, ade2* cells over red *ade2* cells. *Current Genetics* **30**: 485-92.
- Ullah, H., J.G. Chen, B. Temple, D.C. Boyes, J.M. Alonso, K.R. Davis, J.R. Ecker, and A.M. Jones. 2003. The beta-subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* **15**: 393-409.
- Ullah, H., J.G. Chen, S. Wang, and A.M. Jones. 2002. Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. *Plant Physiology* **129**: 897-907.
- Ullah, H., J.G. Chen, J.C. Young, K.H. Im, M.R. Sussman, and A.M. Jones. 2001. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. *Science* **292**: 2066-9.
- Vera-Estrella, R., V.J. Higgins, and E. Blumwald. 1994. Plant Defense Response to Fungal Pathogens (II. G-Protein-Mediated Changes in Host Plasma Membrane Redox Reactions). *Plant Physiology* **106**: 97-102.
- Viehweger, K., B. Dordschbal, and W. Roos. 2002. Elicitor-activated phospholipase A(2) generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H(+) pool for pH signaling via the activation of Na(+)-dependent proton fluxes. *Plant Cell* **14**: 1509-25.
- Viehweger, K., W. Schwartze, B. Schumann, W. Lein, and W. Roos. 2006. The Galpha protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell* **18**: 1510-23.
- Vij, S. and A.K. Tyagi. 2006. Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics* **276**: 565-75.
- Vilardaga, J.P., M. Bunemann, C. Krasel, M. Castro, and M.J. Lohse. 2003. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nature Biotechnology* **21**: 807-12.
- Volland, C., D. Urban-Grimal, G. Geraud, and R. Haguenaer-Tsapis. 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 9833-41.
- Wang, D., Y. Guo, C. Wu, G. Yang, Y. Li, and C. Zheng. 2008. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* **9**: 44.
- Wang, L., Y.Y. Xu, Q.B. Ma, D. Li, Z.H. Xu, and K. Chong. 2006. Heterotrimeric G protein alpha subunit is involved in rice brassinosteroid response. *Cell Research* **16**: 916-22.

- Wang, S., S. Narendra, and N. Fedoroff. 2007. Heterotrimeric G protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 3817-22.
- Wang, X. 2004. Lipid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 329-36.
- Wang, X.Q., H. Ullah, A.M. Jones, and S.M. Assmann. 2001. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science* **292**: 2070-2.
- Warpeha, K.M., S.S. Lateef, Y. Lapik, M. Anderson, B.S. Lee, and L.S. Kaufman. 2006. G-protein-coupled receptor 1, G-protein Galpha-subunit 1, and prephenate dehydratase 1 are required for blue light-induced production of phenylalanine in etiolated Arabidopsis. *Plant Physiology* **140**: 844-55.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-97.
- Watkins, D.C., G.L. Johnson, and C.C. Malbon. 1992. Regulation of the differentiation of teratocarcinoma cells into primitive endoderm by G alpha i2. *Science* **258**: 1373-5.
- Weerasinghe, R.R., S.J. Swanson, S.F. Okada, M.B. Garrett, S.Y. Kim, G. Stacey, R.C. Boucher, S. Gilroy, and A.M. Jones. 2009. Touch induces ATP release in Arabidopsis roots that is modulated by the heterotrimeric G-protein complex. *FEBS Letters* **583**: 2521-6.
- Yanofsky, M.F., H. Ma, J.L. Bowman, G.N. Drews, K.A. Feldmann, and E.M. Meyerowitz. 1990. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35-9.
- Zech, S.G., A.J. Wand, and A.E. McDermott. 2005. Protein structure determination by high-resolution solid-state NMR spectroscopy: application to microcrystalline ubiquitin. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 8618-26.
- Zhao, J. and X. Wang. 2004. Arabidopsis phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein alpha-subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 1794-800.

DANKSAGUNG

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank!

Dieser gilt...

an erster Stelle Herrn Prof. Werner Roos für die Überlassung des interessanten Themas dieser Doktorarbeit. Desweiteren für die engagierte Betreuung, viele konstruktive Ratschläge und förderliche Diskussionen, welche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) für die zahlreichen massenspektrometrischen Untersuchungen sowie hilfreiche Anmerkungen zur Auswertung der entsprechenden Ergebnisse.

allen Mitgliedern der Abteilung Molekulare Zellbiologie für die angenehme Zusammenarbeit, ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

nicht zuletzt meiner Familie, Freunden und vor allem meinem Freund für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten, sowie für ihre Ermutigung und Aufmunterung in schwierigen Momenten.

DANKESCHÖN!

Werdegang

*28 Juli 1980, Bautzen

ledig

Hochschulausbildung

- seit 01/2006 **Promotion** am Institut für Pharmazie, Abt. Molekulare Zellbiologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
- Thema: „Die Auffindung neuer Bindepartner pflanzlicher $G\alpha$ -Proteine durch genetische, zellbiologische und biochemische Methoden“
- [Stipendiatin des Graduiertenprogramms „Pflanzliche Proteinkomplexe – Struktur, Funktion und Evolution“ im Rahmen des Exzellenznetzwerkes Sachsen-Anhalt und der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg]
- 10/1999 - 02/2005 **Studium Biologie** an der Technischen Universität Dresden
- Diplomprüfungsfächer: Genetik
 Immunologie
 Mikrobiologie
 - Abschluss: Dipl. Biologin (Note 1,6)

Schulbildung

- 1991 - 1999 Albert-Einstein-Gymnasium in Bautzen
- Abschluss: Abitur (Note 2,0)
- 1990 - 1991 Mittelschule in Malschwitz
- 1987 - 1990 Grundschule in Malschwitz

Praxiserfahrung

2002	Studentische Hilfskraft (SHK) in der Molekularen Genetik (TU Dresden)
2003 - 2004	SHK in der Molekularen Biotechnologie (TU Dresden)
06 - 07/2003	Betriebspraktikum in der Bundesanstalt für Züchtungsforschung (BAZ), Institut für Obstzüchtung in Dresden
03 - 06/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Mol. Biotechnologie (TU Dresden)
07 - 12/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Neuroonkologischen Labor der Poliklinik für Neurochirurgie (MLU Halle-Wittenberg) Thema: „Noninvasives Imaging des therapeutischen Erfolgs onkolytischer Viren am Beispiel menschlicher Gliome.“
01, 02, 10/2010	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Mol. Biotechnologie (TU Dresden)
02, 03/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Abt. Molekulare Zellbiologie (MLU Halle-Wittenberg)

Wissenschaftlicher Austausch

07/2004	15. Internationaler Kongress der Arabidopsisforschung in Berlin (Förderung: Gesellschaft von Freunden und Förderern der TU DD e. V.)
04/2005	Forschungsaustausch (FT Infrarot Spektroskopie) mit der Universität Leipzig im Rahmen der Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Molekularen Biotechnologie (TU Dresden)
09/2007	Botanikertagung in Hamburg
09/2009	Botanikertagung in Leipzig
2006.-.2009	Teilnahme am Graduiertenprogramm mit regelmäßiger Vorstellung der Forschungsergebnisse anhand von Vorträgen, Posterpräsentationen und Diskussionsrunden

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Diplomarbeit

Wolf C., (2005) "Klonierung eines Genkonstruktes zur Komplementation der pollensterilen Apyrase-Doppelknockoutmutante in *A. thaliana.*", *TU Dresden, Molekulare Biotechnologie*

Carolin Wolf

Braunschweigerstrasse 8
01127 Dresden
0351 / 32 13 566
caro_wolf@web.de

Poster

Wolf C. und Steinebrunner I., (2004) "Partial complementation of the pollen defective apyrase mutation.", *TU Dresden, Molecular Biotechnology*

Wolf C. und Roos W., (2007) "Searching for interactors of the plant heterotrimeric G-protein.", *Martin-Luther-University of Halle, Institute of Pharmacy, Dept. of Molecular Cell Biology*

Wolf C., Heinze M. und Roos W., (2008) "Targets of the plant G-protein elucidated via the Split Ubiquitin Screen.", *Martin-Luther-University of Halle, Institute of Pharmacy, Dept. of Molecular Cell Biology*

Wolf C. und Roos W., (2008) "G-protein-target complexes and their role in plant signalling.", *Martin-Luther-University of Halle, Institute of Pharmacy, Dept. of Molecular Cell Biology*

Wolf C. und Roos W., (2009) "New targets of the plant G α -protein revealed by a modified split ubiquitin assay.", *Martin-Luther-University of Halle, Institute of Pharmacy, Dept. of Molecular Cell Biology*

Publikationen

Wolf C., Hennig M., Romanovicz D. und Steinebrunner I. (2007) "Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants." *Plant Mol Biol* **64**(6): 657-72.

Wu J., Steinebrunner I., Sun Y., Butterfield T., Torres J., Arnold D., Gonzalez A., Jacob F., Reichler S. und Roux S. J. (2007) "Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in Arabidopsis." *Plant Physiol* **144**(2): 961-75.

Wolf C. und Roos W. (in process) "The split-ubiquitin system reveals new interactors and potential targets of the plant G α -protein."

6. Oktober 2010

Carolin Wolf

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema

„Die Auffindung neuer Bindepartner pflanzlicher G α -Proteine durch genetische, zellbiologische und biochemische Methoden“

von mir selbst, ohne die unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Doktorarbeit wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, deren Promotionsordnung ich anerkenne, vorgelegt.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Dresden, den 6. Oktober 2010

Carolin Wolf