

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE GENETIK

---



**Hochdurchsatz Generierung und Analyse von  
*Arabidopsis thaliana*-Proteinen**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Tanja Feilner

geb. am 07.07.1972  
in Bayreuth

Berlin, September 2004

Erstgutachter:

Prof. Dr. Hans Lehrach

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Thomas Schmülling

Tag der Disputation: 08.02.2005

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Arabidopsis thaliana und die verwendeten Gewebe	1
1.1.1	Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand)	1
1.1.2	Die verwendeten Gewebe	2
1.2	Proteomics	3
1.3	Gewinnung von Proteinen im Hochdurchsatz	5
1.3.1	Strategien zur Hochdurchsatz-Klonierung	6
1.3.2	Proteinexpression im Hochdurchsatz	8
1.3.3	Proteinaufreinigung im Hochdurchsatz	9
1.4	Protein-Arrays und deren Anwendung	10
1.4.1	Grundlagen zur Array-Technologie	10
1.4.2	Oberflächen	12
1.4.3	Detektion	13
1.4.4	Analytische und funktionelle Protein-Microarrays	14
1.5	Phosphorylierung als eine posttranslationale Proteinmodifikation	14
1.5.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)	15
1.6	Zielsetzung	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien	20
2.1.2	Proteine, Antikörper und Enzyme	21
2.1.3	Synthetische Oligonukleotide	22
2.1.4	Andere Materialien	22
2.1.5	Labor-Ausrüstung	23
2.1.6	Kits	24
2.1.7	Medien, Puffer und Lösungen	25
2.1.7.1	Medien	25
2.1.7.2	Kompetente Zellen	26
2.1.7.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarosegele	26
2.1.7.4	Prozessierung der Koloniefilter	27
2.1.7.5	Antikörper-Bindungstests mit Filtern	27
2.1.7.6	SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	28
2.1.7.7	Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen	28
2.1.7.8	Proteinreinigung unter nativen Bedingungen	29
2.1.7.9	Phosphorylierungs-Assay	29
2.1.8	Software	29
2.1.9	Stämme	30
2.1.10	Plasmid-Konstrukte	31
2.1.10.1	pQE30NASTattB	32
2.1.10.2	pQE30NASTDV	33
2.1.10.3	pENTR1a	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Herstellung von zwei Arabidopsis cDNA-Bibliotheken	35
2.2.1.1	cDNA-Synthese und Größenfraktionierung	35
2.2.1.2	Fällung der cDNA	37
2.2.1.3	Vektorpräparationen	37

2.2.1.4	Ligation der cDNAs mit den Vektoren .....	38
2.2.1.5	Herstellung elektrokompetenter E. coli SCS1/pSE111-Zellen .....	39
2.2.1.6	Ermittlung der Transformationskompetenz der kompetenten Zellen .....	39
2.2.1.7	Transformation von E. coli mittels Elektroporation .....	40
2.2.1.8	Anordnung und Replikation einer cDNA-Bibliothek .....	40
2.2.2	Herstellung eines Proteinexpressionssubsets der cDNA-Expressionsbibliothek .....	42
2.2.2.1	Herstellen von Hochdichte-Proteinfiltern der cDNA-Expressionsbibliothek .....	42
2.2.2.2	Proteinexpression und Prozessierung der Filter .....	43
2.2.2.3	Immunofärbung und Auswertung der Proteinfilter .....	44
2.2.2.4	Neuordnung einer cDNA-Bibliothek zur Erstellung einer Unterbibliothek mit potentiellen Proteinexpressionsklonen .....	45
2.2.3	Herstellung eines Uniklonsets einer Arabidopsis cDNA-Expressionsbibliothek .....	45
2.2.3.1	Sequenzierung .....	45
2.2.3.2	Qualitätskontrolle der Sequenzen .....	45
2.2.3.3	BLAST-Analyse der Sequenzen .....	47
2.2.3.4	Cluster-Analyse der Sequenzen .....	48
2.2.3.5	Selektion der Klone für das Uniklonset .....	49
2.2.3.6	Anordnung des Uniklonsets .....	50
2.2.3.7	Erweiterung des Uniklonsets durch vollständige cDNA-Expressionsklone .....	50
2.2.4	Weitere nukleinsäuretechnische Methoden .....	52
2.2.4.1	Plasmidpräparation .....	52
2.2.4.2	Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	53
2.2.4.3	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	53
2.2.4.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	55
2.2.4.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	55
2.2.5	Weitere proteinchemische Methoden .....	56
2.2.5.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	56
2.2.5.2	Westernblot .....	58
2.2.5.3	Proteinexpression in E. coli in 96 well Format (1 ml Kultur) .....	58
2.2.5.4	Denaturierende Aufreinigung im 96 well Format von Proteinen mit RGS His <sub>6</sub> -Tag .....	59
2.2.5.5	Bradford-Test .....	59
2.2.6	Spotten von aufgereinigten Proteinen auf beschichtete Glas-Microarrays (FAST <sup>TM</sup> -Slides) .....	60
2.2.6.1	Herstellung eines Test-Microarrays .....	60
2.2.6.2	Spotten der Proteine des Erweiterten Uniklonset .....	61
2.2.6.3	Antikörper-screening der gespotteten Protein-Microarrays .....	64
2.2.6.4	Kinase-Assays auf den Protein-Microarrays des Erweiterten Uniklonsets mit radioaktivem $\gamma$ -ATP .....	65
2.2.6.5	Detektion und Quantifizierung der potentiellen Phosphorylierungs-Targets .....	67
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>71</b>
3.1	Herstellung der cDNA-Bibliotheken .....	71
3.1.1	Verwendete Strategien .....	71
3.1.2	cDNA-Synthese .....	72
3.1.3	Vektorpräparation .....	73

3.1.4	Ligation, Transformation beider cDNA-Bibliotheken und Anordnung der Infloreszenz cDNA-Bibliothek .....	74
3.2	Charakterisierung der cDNA-Bibliotheken .....	75
3.2.1	Bestimmung der durchschnittlichen Insertlängen .....	75
3.2.1.1	Pistill cDNA-Bibliothek .....	75
3.2.1.2	Infloreszenz cDNA-Bibliothek .....	77
3.2.2	Sequenzanalysen beider cDNA-Bibliotheken .....	78
3.2.2.1	Testsequenzierung der Pistill cDNA-Bibliothek .....	78
3.2.2.2	Testsequenzierung der Infloreszenz cDNA-Bibliothek .....	78
3.3	Erstellung einer Proteinexpressions-Unterbibliothek der ATM1 cDNA-Bibliothek .....	80
3.3.1	Identifizierung potentieller Expressionsklone der ATM1 Bibliothek mit Hilfe von Hochdichte-Proteinfiltern .....	80
3.4	Erstellung des Uniklonsets der ATM1 cDNA-Bibliothek .....	82
3.4.1	Sequenzierung .....	82
3.4.2	Sequenzanalyse .....	84
3.4.2.1	BLAST-Analyse .....	84
3.4.2.2	Cluster-Analyse .....	85
3.4.3	Selektion der Klone für das Uniklonset .....	86
3.4.4	Erweiterung des Uniklonsets durch cDNA Expressionsklone, die in voller Länge vorlagen .....	88
3.4.5	Reinigung von 96 rekombinanten Proteinen des Uniklonsets und Erstellung eines Testmicroarrays .....	89
3.4.6	Bradford-Test .....	93
3.5	Spotten und Phosphorylierung des Erweiterten Uniklonsets .....	93
3.5.1	Detektion potentieller Phosphorylierungs-Targets .....	94
3.5.1.1	Vorversuche .....	94
3.5.1.2	Etablierung der Quantifizierung potentieller Targets im dichten Spotpattern .....	94
3.5.2	Vergleich potentieller Phosphorylierungs-Targets der verschiedenen Kinasen .....	109
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
4.1	Gewinnung rekombinanter Arabidopsis Proteine .....	113
4.1.1	Herstellung und Charakterisierung von zwei cDNA-Bibliotheken .....	113
4.1.2	Identifizierung potentieller Expressionsklone und Herstellung der Proteinexpressions-Unterbibliothek .....	117
4.1.3	Charakterisierung der Proteinexpressions-Unterbibliothek .....	118
4.1.4	Erstellung des Uniklonsets .....	120
4.1.5	Herstellung von Protein-Microarrays des Erweiterten Uniklonsets .....	122
4.2	Phosphorylierungsstudien als Funktionelle Analyse .....	124
4.2.1	Vergleich von Phosphorylierungsstudien .....	124
4.2.2	Phosphorylierungsstudien mit den Proteinen des Erweiterten Uniklonsets .....	127
4.2.2.1	Quantifizierung mittels Proteinkinase A .....	127
4.2.2.2	Phosphorylierungsstudien unter Verwendung der Arabidopsis Kinasen MPK3 und MPK6 .....	129
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>146</b>

<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b> .....	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>153</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>170</b>