

1 Einleitung

1.1 *Arabidopsis thaliana* und die verwendeten Gewebe

1.1.1 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand)

Arabidopsis thaliana zählt zu den Wildkräutern und ist eine einjährige Pflanze. Sie gehört zu der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütengewächse), ist ein Kohlgewächs und ein naher Verwandter von Senf, Raps und Blumenkohl. *Arabidopsis* ist heimisch in West-Eurasien, wurde durch den Menschen jedoch auch in Ostasien (Japan) und Amerika, sowie in geringerem Maße auch in Australien, Neuseeland und Chile verbreitet.

Arabidopsis thaliana hat sich aus vielerlei Gründen zu einem der wichtigsten Modellorganismen für klassische und molekulargenetische Studien entwickelt.

Diese Pflanze weist mit 10.000 – 30.000 Samen pro Pflanze eine hohe Reproduktionsrate auf, ist relativ klein (Höhe: 30 – 40 cm) und benötigt relativ wenig Platz (300 Pflanzen/m²). Zudem lässt sie sich mit einer Generationszeit von etwa sechs bis acht Wochen schnell kultivieren.

Darüber hinaus wurde im Dezember 2000 die vollständige Genomsequenz von *Arabidopsis thaliana* in „Nature“ veröffentlicht (*Arabidopsis*-Genome-Initiative, 2000). Das Genom ist gegenüber anderen Pflanzen mit ungefähr 130 Mbp relativ klein und besteht aus schätzungsweise 28.000 Genen, welche sich auf 5 Chromosomen verteilen. Die Genomgröße bei Pflanzen weist eine hohe Varianz auf: Raps hat eine Genomgröße von 1,2 Gbp, Mais von 3 Gbp, Gerste von 5 Gbp und Weizen sogar eine Genomgröße von 16 Gbp. Obwohl die Genomgröße von *Arabidopsis* vergleichbar ist mit der von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, ist bei dieser Pflanze eine größere Anzahl von Genen vorzufinden. Das Genom von *C. elegans* mit ungefähr 100 Mbp kodiert für etwa 19.000 Gene und das von *Drosophila* mit ca. 120 Mbp für schätzungsweise 13.600 Gene (Adams *et al.*, 2000; *C.elegans*-Sequencing-Consortium, 1998). Bei den beiden weiteren bekannten Genomen von Reis konnte eine Genomgröße von ungefähr 430 Mbp festgestellt werden, die für ca. 50.000 Gene kodieren (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

1.1.2 Die verwendeten Gewebe

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Gewebe, Pistill (Blütenstempel) und Infloreszenz (Blütenstand), ausgewählt, von denen erwartet wurde, dass sie eine hohe Transkriptions- und Translationsaktivität aufweisen.

Pistill ist das weibliche Sexualorgan der Pflanze. Hier erfolgt die Befruchtung durch den wind- oder insektenvermittelten Transport von Pollen, den männlichen Gameten.

Die Pistill besteht aus Narbe, Griffel und Fruchtknoten:

- Die Narbe (Stigma) dient zum Auffangen und Keimen des Pollens.
- Der Griffel (Stylus) ist der Bereich, in dem die Pollenschläuche mit männlichen Keimzellen dem Fruchtknoten entgegen wachsen.
- Der Fruchtknoten (Ovarium) enthält die Samenanlagen.

Die **Infloreszenz** wurde gewählt, da die Blütenbildung den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase darstellt. Aus diesem Grunde sind in diesem, sowohl Proteine der vegetativen Phase als auch der reproduktiven Phase zu erwarten.

Arabidopsis thaliana folgt in seiner Entwicklung den gleichen Mustern wie alle Angiospermen (Bedecktsamer). Die Entwicklung besteht aus drei sich überlappenden Entwicklungsphasen, die alle im Sprossapikalmeristem zentriert sind:

- vegetatives Meristem, welches Blätter produziert,
- Infloreszenz, welches das Blühmeristem produziert,
- Blühmeristem, welches sich bei einer normalen *Arabidopsis*-Blüte aus vier Kelchblättern (Sepalen), vier weißen Blütenblättern (Petalen), sechs Staubblättern (Stamina) und aus einem Stempel (Pistillum), bestehend aus zwei Fruchtblättern (Karpelle), zusammensetzt

Das Sprossmeristem wird dazu veranlasst, an Stelle der Laubblätter Kelchblätter, Blütenblätter, Staubblätter und Fruchtblätter auszubilden. Dieser Übergang kann erst in einem bestimmten Lebensalter der Pflanze erfolgen, welches innerhalb bestimmter Grenzen genetisch fixiert ist: die Pflanze muss das Stadium der Blühreife erreicht haben. Wann das der Fall ist, ist von Art zu Art sehr unterschiedlich. Ist die Pflanze blühreif, so kann sie zur Blütenbildung gebracht werden. Dabei können zwei Etappen voneinander unterschieden werden, die Blühinduktion und die Differenzierung der Blüten und Blütenstände (Heß, 1991).

Vegetative Meristeme können sich, wenn die Pflanze eine Blühinduktion erfährt, direkt in Blühmeristeme umwandeln. In vielen Fällen, wie z.B. bei *Arabidopsis*, werden vegetative

Meristeme nicht direkt in Blühmeristeme umgewandelt; stattdessen wird das vegetative Meristem erst in ein Infloreszenzmeristem überführt.

1.2 Proteomics

Proteomics ist eine wesentliche Forschungsrichtung der modernen Biowissenschaften. Neben **Proteomics** (Studie der Proteine) kann man noch zwischen **Genomics** (Studie der Geninformation) und **Transkriptomics** (Studie der mRNA-Expression) unterscheiden:

Unter **Genomics** versteht man die Ermittlung (DNA-Sequenzierung) und die Analyse der Informationen, die in der genomischen DNA eines Organismus (im Genom) vorhanden ist. Das gesamte Genom beinhaltet alle Möglichkeiten und Grenzen, die ein Organismus hat, um sich zu entwickeln, zu differenzieren, zu interagieren und auf extrazelluläre und intrazelluläre Änderungen zu reagieren. Diese zellulären Reaktionen werden u.a. mit Techniken aus Transkriptomics und Proteomics intensiv untersucht, und die resultierenden Daten im Kontext der biologischen Fragestellung diskutiert.

Transkriptomics untersucht die Gesamtheit der nach der Transkription von Genen entstehenden mRNA und damit die spezifische Nutzung der durch das Genom gegebenen Möglichkeiten, bezogen auf ein Teilkompartiment (Organ, Gewebe und Zelle) und einen bestimmten Zustand (situationsabhängig). Diese Untersuchungen können u. a. mit Hilfe von DNA-Microarrays erfolgen. Die Anwendung dieser Methode erlaubt Aussagen über die Genexpression sowie über die Variation innerhalb von Gensequenzen im Hochdurchsatzformat (DeRisi *et al.*, 1997; Fields *et al.*, 1999). Jedoch ist es mittels DNA-Microarrays nur begrenzt möglich, posttranskriptionelle (z.B. splicing) bzw. nicht möglich, posttranslatorische Modifikationen nachzuweisen.

Dieses wird insbesondere mit Hilfe von verschiedenen **Proteomics**-Techniken ermöglicht. Dabei bauen Proteomics und Transkriptomics auf die im Genomics- Bereich gewonnenen Informationen auf. Unter Proteomics versteht man das Studium der Gesamtheit der Proteine, die in einer Organelle, einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus unter definierten Bedingungen vorhanden sind.

Dabei wird ein umfassendes Verständnis von zellulären Vorgängen in Zukunft nur durch die Verknüpfung der gewonnen Daten aller drei Methoden möglich sein.

Mit unterschiedlichsten Proteomics-Techniken können bestimmte zeit- und ortsbedingte Proteingehalte ermittelt werden. Änderungen des Proteingehaltes, Proteinmodifikationen (wie Glykosylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen), die Bildung von Multiproteinkomplexen sowie Interaktionen der Proteine untereinander und mit anderen Molekülen, lassen Rückschlüsse auf die Funktion dieser Proteine zu.

Als eine klassische Proteomics-Methode kann die 2-dimensionale Gel- Elektrophorese (2DE) angesehen werden (Klose, 1975; Klose *et al.*, 2002; O'Farrell, 1975). Hier erfolgt die Trennung der Proteine in zwei unabhängigen Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystemen. Im ersten Trennsystem werden die Proteine durch isoelektrische Fokussierung mittels pH-Gradienten, im zweiten Trennsystem durch SDS-PAGE getrennt. Limitierende Faktoren dieser Methode wurden ausführlich von Kersten *et al.* 2004a beschrieben. Dazu gehört, dass einerseits der Arbeitsaufwand sehr hoch ist und die Standardisierung der Extraktpräparation noch optimierungsbedürftig ist. Andererseits hängt die Genauigkeit der Methode sehr stark von der Qualität der 2DE-Gele und den Laufbedingungen ab, was zur Folge hat, dass diese Methode schwer reproduzierbar ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass nur ein Teil der in der Probe enthaltenen Proteine nachgewiesen werden kann. Sehr große und sehr kleine, ebenso wie sehr basische und sehr saure Proteine können nicht erfasst werden. Die Proteine können anschließend mittels verschiedener Färbetechniken wie z.B. Coomassie-Färbung (Diezel *et al.*, 1972), Silber-Färbung (Heukeshoven und Dernick, 1985) oder Fluoreszenz-Färbung (Patton, 2000) visualisiert werden.

Allerdings kann man mit Hilfe der 2DE-Methode allein keine Aussagen über die Identität bzw. Aminosäuresequenz der Proteine machen. Zur Identifizierung der aufgetrennten Proteine wird heutzutage die 2DE-Methode mit einer anschließenden Massenspektroskopie (MS) kombiniert (Andersen *et al.*, 1996; Hillenkamp und Karas, 1990).

Zwar können die aufgetrennten Proteine mittels 2DE in hoher Qualität identifiziert und katalogisiert werden, jedoch liegen die Proteine anschließend in denaturierter Form vor und können somit nicht für zukünftige funktionelle Studien eingesetzt werden.

Für funktionelle Studien ist die Expression der zu untersuchenden Proteine in rekombinanter Form häufig unerlässlich (Kersten *et al.*, 2002). Um Protein-Protein-Interaktionen bzw. um Interaktionspartner zu einem bekannten Protein zu finden, können sowohl die *Two-Hybrid* Systeme (Chien *et al.*, 1991; Dove und Hochschild, 2004; Fields und Sternglanz, 1994; Joung *et al.*, 2000) als auch Protein-Microarrays (MacBeath und Schreiber, 2000; Martinsky, 2004) eingesetzt werden.

Das *Yeast-Two-Hybrid-System* (Y2H) beruht auf der Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors in Hefe durch die Wechselwirkung zweier Proteine, von denen das eine Protein (*bait*) an die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und das andere Protein (*prey*) an die Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD) des Transkriptionsfaktors fusioniert ist. Diese Interaktion führt innerhalb eines geeigneten Hefe-Stammes zur Transkription und Translation von Reportergenen, welche die Interaktion von zwei Proteinen über detektierbare Signale anzeigen. Häufig erfolgt die Detektion durch die bei der Interaktion ermöglichte Expression eines lacZ Gens. Die Hefe exprimiert β -Galactosidase, wodurch es in einem X-Gal-haltigen Medium zur Spaltung des X-Gals und somit zu einer Blaufärbung kommt. Als Problem bei dieser Methode kann die Detektionsempfindlichkeit betrachtet werden. Die Detektionssignale werden über zwei Stufen verstärkt. Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen bewirkt zunächst die Transkription vieler fusionierter Detektionsproteine (z.B. β -Galactosidase), die ihrerseits viele Substratmoleküle umsetzt. Die so erreichte Empfindlichkeit begünstigt jedoch auch das Auftreten von falschpositiven Klonen. Hochdurchsatzmethoden zur Anwendung des Yeast-Two-Hybrid wurden unter anderem von Pandey und Mann 2000 beschrieben.

Als eine weitere vielversprechende Proteomics-Methode kristallisiert sich in den letzten Jahren die Protein-Microarraytechnologie heraus (MacBeath und Schreiber, 2000; Templin *et al.*, 2003; Zhu und Snyder, 2003a). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Untersuchung einer hohen Anzahl zu untersuchender Proteine auf kleinsten Raum, wie z. B. enzymatische Umsetzung und Wechselwirkungsanalysen mit unterschiedlichsten potentiellen Interaktionspartnern.

Hierbei ist die Etablierung von Versuchsapparaturen unerlässlich, die es zulassen, den Versuchsablauf zu miniaturisieren und simultan zu gestalten, um den Versuchsaufwand, die Kosten sowie den Verbrauch des Probenmaterials zu reduzieren. Bei dieser Methode werden die (meist rekombinanten) Proteine auf der Oberfläche von Objektträgern angeordnet und immobilisiert. Durch die gerichtete Anordnung können die korrespondierenden DNA-Sequenzen direkt mit den gespotteten Proteinen verknüpft werden (Cahill, 2001).

1.3 Gewinnung von Proteinen im Hochdurchsatz

Die Gewinnung von rekombinanten Proteinen im Hochdurchsatz beinhaltet zunächst die Synthese der cDNA-Moleküle aus mRNA, welche anschließend mittels Hochdurchsatz-Klonierung in geeignete Vektorsysteme überführt werden.

1.3.1 Strategien zur Hochdurchsatz-Klonierung

ORF-Ansatz

Hierbei handelt es sich um eine parallel gerichtete Klonierung von *open reading frames* (ORFs) in möglichst voller Länge nach Amplifikation ausgehend von cDNA oder genomischer DNA (bei Genen ohne Introns) mittels genspezifischer Primer.

Diese gerichtete Klonierung kann mittels Restriktionsenzym-Spaltung und anschließender Ligation oder mittels Rekombination, z.B. mit der GATEWAY™-Technologie, erfolgen. Letztere Methode ist besonders gut für den Hochdurchsatz geeignet (Heyman *et al.*, 1999; Walhout *et al.*, 2000).

Die GATEWAY-Technologie basiert im wesentlichen auf zwei Rekombinationen (BP- und LR-Reaktion, Abb. 1.1) und beruhend auf der Verwendung von Lambda-Rekombinase und Rekombinationsstellen. Die kodierende Sequenz der zu untersuchenden Gene kann als PCR-Produkt oder von einer cDNA-Bibliothek durch sequenzspezifische Rekombination (BP-Reaktion) in den sog. Entryvektor übertragen werden. Mit Hilfe des Entryvektors ist es dann möglich, das Gen in verschiedene Destinationsvektoren und Expressionssysteme zu überführen.

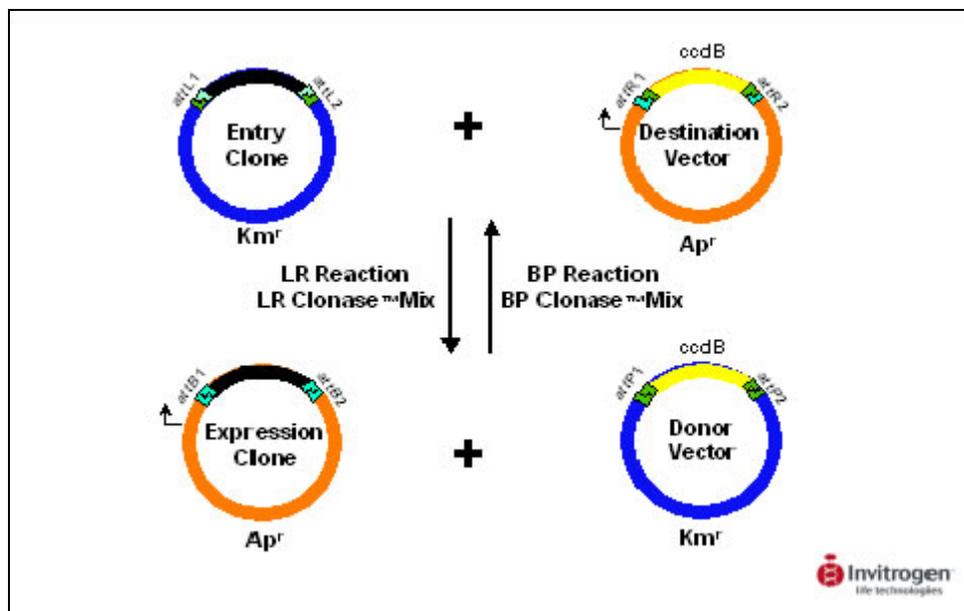


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Rekombinationstechnologie (GATEWAY-Technologie).

Im wesentlichen verlaufen die BP- und die LR- Reaktionen folgendermaßen:

Bei der **BP-Reaktion** wird das Gen mit zwei attB-Rekombinationsstellen flankiert und mit den beiden attP-Rekombinationsstellen des Donorvektors rekombiniert. Damit das Gen in der richtigen Orientierung in den Donorvektor rekombiniert wird, gibt es zwischen den

attB1- und attB2-Rekombinationsstellen, wie auch zwischen den attP1- und attP2-Rekombinationsstellen geringe Unterschiede in der DNA-Sequenz, die dazu führen, dass attB1 nur mit attP1 und attB2 nur mit attP2 rekombinieren können. Die bei dieser Rekombination entstandenen Eingangsklone (Entryklone) enthalten das Gen, welches jetzt von den attL1- und attL2-Rekombinationsstellen flankiert ist.

Die **LR-Reaktion** beinhaltet den Transfer des Gens, flankiert mit attL-Rekombinationsstellen, in einen Expressionsvektor und funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Die zwei attL-Rekombinationsstellen werden nun mit den beiden attR-Rekombinationsstellen des Destinationsvektors rekombiniert. Die richtige Orientierung wird auch hier wieder durch kleine DNA-Sequenz Unterschiede in den entsprechenden Rekombinationsstellen gewährleistet.

Sowohl die Entryklone als auch die Expressionsklone können aufgrund variierender Resistenzen selektiert werden. Jedoch kommt bei beiden Reaktionen (BP und LR) noch eine weitere Selektionsmöglichkeit hinzu. Sowohl beim Donorvektor (BP-Reaktion) als auch beim Destinationsvektor (LR-Reaktion) befindet sich zwischen den Rekombinationsstellen das *ccdB*-Gen. Das *ccdB*-Gen ist ein „Suizid-Gen“, dessen Genprodukt mit der *E. coli*-DNA-Gyrase interferiert (Bernard und Couturier, 1992). Die Selektion basiert auf dem Austausch des *ccdB*-Gens gegen das einzubringende Gen. Nur die Plasmide ohne *ccdB*-Gen, aber mit der entsprechenden Resistenz können Kolonien bilden.

Bibliotheken-Ansatz

Eine zweite Strategie zur Hochdurchsatz-Klonierung beruht darauf, dass man die Gesamt-RNA eines definierten Gewebes, Zelltypus oder Organismus', nach Entfernung der genomischen DNA, gewinnt. Danach wird die mRNA isoliert und davon ausgehend die cDNA synthetisiert. Die generierten cDNA-Moleküle werden anschließend in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert.

Diese Vektoren ermöglichen die Expression von Proteinen, welche an einem Tag fusioniert sind. Mit Hilfe dieses Tags können die potentiellen Expressionsklone selektiert werden und darauf basierend eine cDNA Expressionsbank hergestellt werden (Büssow *et al.*, 1998; Büssow *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 1999; Holz *et al.*, 2001).

Mit dem ORF-Ansatz können die Gene im richtigen Leserahmen (*reading frame*) und in voller Länge kloniert werden. Jedoch ist dieser Ansatz von der Verfügbarkeit der Sequenzinformation sowie der Qualität der Genannotation abhängig. Beim Bibliotheken-

Ansatz sind diese Informationen nicht notwendig, dafür wird jedoch nur ein Teil der Gene im richtigen Leserahmen kloniert. Einige selten vorkommende RNAs werden nicht unbedingt erfasst und nicht alle cDNAs können in voller Länge kloniert werden. Weiterhin können Klone auch einen Teil der 5'-untranslatierten Region aufweisen, die eine artifizielle zusätzliche Proteinsequenz bilden und damit weitere Untersuchungen beeinflussen kann. Des Weiteren können interne Stopcodonen der 5'-UTR die Proteinexpression verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Hochdurchsatzherstellung von Expressionsklonen der Bibliotheken-Ansatz verwendet.

1.3.2 Proteinexpression im Hochdurchsatz

Nach der Wahl des Klonierungssystems steht man vor der Frage, welches Expressionssystem das geeignetste ist. Die wohl bekanntesten Expressionssysteme sind das bakterielle System *Escherichia coli* und die eukaryontischen Hefesysteme *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*.

Dabei werden hier andere Expressionssysteme als *E. coli* zwar kurz mit Vor- und Nachteilen erläutert, jedoch kamen diese für diese Arbeit nicht in Frage, da die Expressions- und Aufreinigungssysteme für *E. coli* in der Arbeitsgruppe bereits etabliert waren.

E. coli Zellen sind leicht genetisch zu manipulieren und zeichnen sich durch eine hohe Wachstumsrate, niedrige Nährstoffansprüche und eine hohe Kapazität der Proteinsynthese aus. Darüber hinaus sind sie einfach zu kultivieren und kostengünstig. Es konnte gezeigt werden, dass auch menschliche Proteine in löslicher Form in diesem System aufgereinigt werden können. So lagen bei Braun *et al.* 2002 46% der 326 getesteten humanen Proteine nach der Expression in löslicher Form vor. Jedoch gibt es auch hier Nachteile: Da *E. coli* als prokaryontische Organismen über keine membrangetrennten Zellorganellen verfügen, werden die Proteine direkt im reduzierenden Zytosol synthetisiert, und eukaryontische Proteine werden dann häufig unvollständig gefaltet. Darüber hinaus können die überproduzierten und falsch gefalteten Proteine unlösliche und funktionslose Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) bilden. Des Weiteren sind die bakteriellen Expressionssysteme nicht in der Lage, solche für die eukaryontischen Proteine wichtigen posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. die Ausbildung von Disulfidbrücken, Glykosylierung oder Phosphorylierung, durchzuführen. Bis heute wurden etwa 200 posttranslationale Modifikationen beschrieben, wobei diese teilweise großen Einfluss auf die zellulären Prozesse und die Signalkaskaden haben (Meri und Baumann, 2001; Parekh und Rohlf, 1997). Demgegenüber stehen die eukaryontischen Expressionssysteme (wie Säugertier-, Insekten- und Hefezellen), bei denen die Zellen einen vom Zytoplasma

abgegrenzten Zellkern sowie Zellorganellen mit eigener Membranen besitzen. Die Stoffwechselreaktionen sind nun nicht mehr nur auf das Zytoplasma begrenzt, sondern auf die unterschiedlichen Zellorganellen aufgeteilt. Dadurch sind komplexere Stoffwechsel- und Syntheseschritte, z.B. die Glykosylierung, möglich. Darüber hinaus kann in diesen Systemen die Sekretion der Proteine erfolgen, welche für eine korrekte Faltung der eukaryontischen Proteine häufig unerlässlich ist.

Mit dem Säugetierzellen-Expressionssystem kann man somit einen hohen Anteil an funktionellen Proteinen erhalten. Dieses System produziert die gleichen post-translationalen Modifikationen und erkennt die gleichen Signale für Synthese, Weiterverarbeitung und Sekretion wie die Zellen, aus denen die Sequenzen ursprünglich stammen. Jedoch ist dieses System durch eine niedrige Expressionsrate gekennzeichnet. Darüber hinaus ist es sehr komplex, schwer zu konstruieren, instabil und teuer.

Dagegen erlaubt das Insektenzellen-Expressionssystem die Expression von einer vergleichsweise höhere Ausbeute an Proteinen. Aber auch dieses System hat den Nachteil, dass es unter aufwendigen Wachstumsbedingungen zu kultivieren ist.

Im Gegensatz dazu stellen Hefen ein einfaches eukaryontisches Expressionssystem dar, welches sich durch ein schnelles Wachstum und eine hohe Ausbeute auszeichnet. In diesem System können einige eukaryontische posttranslationale Modifikationen stattfinden. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der zu exprimierenden Proteine in diesem System löslich vorliegt (Harashima, 1994).

Neben der Klonierung im Hochdurchsatz wurden Techniken entwickelt, die eine parallele Expression von vielen Proteinen ermöglichen (Büssow *et al.*, 1998; Lüking *et al.*, 1999). Für diesen Zweck sind *E. coli* und Hefe als Expressionssysteme besonders gut geeignet. Um Proteine sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* exprimieren zu können, haben Lüking *et al.* 2003a ein duales Vektorsystem entwickelt, welches die Expression rekombinater Proteine in beiden Systemen ermöglicht.

1.3.3 Proteinaufreinigung im Hochdurchsatz

Für die Aufreinigung von Proteinen im Hochdurchsatz ist die Anwendung von Affinitätstags weitverbreitet. Die für die Tags kodierenden Bereiche werden zusammen mit den Bereichen für das zu exprimierende Protein transkribiert und translatiert. Aufgrund der hochaffinen Bindung der Tags an bestimmte Trägermaterialien ist die Aufreinigung von Proteinen im Hochdurchsatz möglich (Nilsson *et al.*, 1997). Häufig verwendete Tags sind z.B. die Glutathion S-Transferase (GST)-, Histidin (His)-, FLAG-Tag, Biotin-Tag und Protein A (Phizicky *et al.*; 2003; Schatz *et al.*; 1993; Scheich *et al.*, 2003). Ein Nachteil der

Verwendung von Tags ist, dass es durch den Tag zu einer Veränderung der Struktur und der Funktion der Proteine kommen kann.

Braun *et al.* 2002 haben die Effizienz der Hochdurchsatzaufreinigung von humanen Proteinen aus Bakterienzellen mit Hilfe von vier unterschiedlichen Tags miteinander verglichen. Sie konnten zeigen, dass GST-Fusionsproteine eine höhere Expressionsrate und Aufreinigungseffizienz unter denaturierenden Bedingungen aufwiesen, als die His-Fusionsproteine. Scheich *et al.* 2003 verglichen mit Hilfe eines N-terminalen Tandemtags (His₆- und GST-Tag) die Effizienz der Hochdurchsatz-Proteinaufreinigung unabhängig von der Expressionsrate. Sie konnten zeigen, dass die Proteinaufreinigung über den His₆-Tag unter Verwendung der Ni-NTA Aagrose effizienter war als über den GST-Tag.

1.4 Protein-Arrays und deren Anwendung

1.4.1 Grundlagen zur Array-Technologie

Das Prinzip eines Arrays basiert auf der systematischen Anordnung von Akzeptormolekülen auf einer Fläche. Damit erlaubt ein Array die parallele Analyse einer hohen Anzahl von Molekülen und die Zuordnung der Ergebnisse zu den immobilisierten Molekülen.

Methodisch basieren Protein-Arrays auf den technischen Entwicklungen, die zuvor für DNA-Arrays erfolgten. Bei den DNA-Macroarrays (Hochdichte DNA-Filter) werden cDNAs in Form rekombinanter *E. coli* Kolonien auf eine Membran gespottet; hierbei handelt es sich im weitesten Sinne um eine Art cDNA-Dot Blot. Das Ergebnis waren die sogenannten ‚gridded libraries‘, bei denen jeder Klon eine definierte Position auf der Filtermembran hat (Büssow *et al.*, 1998). Eine weitere Verwendungsmöglichkeit für diese gespotteten Membranen war die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde.

Büssow *et al.* 1998 zeigten eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieses Arrayformates, die Verwendung als Protein-Macroarrays (Hochdichte Protein-Filter). Bei beiden werden cDNA enthaltende Bakterien in hoher Dichte auf PVDF-Membranen gebracht. Allerdings werden nach dem Spotten die Filter unterschiedlich behandelt, so dass man einerseits cDNA-Filter und andererseits Protein-Filter erhalten kann. Auf diese Weise kann man die Filter für ein paralleles Screening mit DNA-Sonden bzw. Antikörpern benutzen.

Aufgrund der hohen Kosten bezüglich der Herstellung bzw. des Kaufes von solchen Membranen und des hohen Verbrauches an Probenmaterialien auf den Membranen, mit einer Größe von 22 cm x 22 cm, wurde die Weiterentwicklung zu Microarrays unumgänglich.

Microarrays bieten dabei generell eine Reihe von Vorteilen gegenüber Macroarrays oder anderen Proteomics-Technologien. Sie zeichnen sich durch eine hohe Dichte von immobilisierten Molekülen auf kleinstem Raum, sowie durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus. Weitere Vorteile von Microarrays sind:

- der Einsatz sehr kleiner Volumina, teils limitierender Substanzen (wie z.B. Serum, Enzyme), was eine hohe Anzahl von unabhängigen Wiederholungen ermöglicht
- der Einsatz kleinster Mengen der gespotteten Moleküle, was ebenfalls eine hohe Anzahl von unabhängigen Wiederholungen ermöglicht
- die systematische Anordnung vieler Moleküle, was eine direkte Zuordnung der Signale ermöglicht
- stärkere Signale durch konzentrierte und fokussierte Auftragung (Spotten) der Moleküle
- mögliche Quantitative Analysen im Gegensatz zu Macroarrays, bei denen eine nicht quantifizierbare *in situ* Proteinexpression stattfindet
- statistische Datenerhebung durch mögliche Spotreplikationen auf einem Microarray und einer hohen Anzahl von verwendeten Microarrays

Ein Durchbruch in diese Richtung gelang damit, dass statt der flexiblen Nylonmembran festes Trägermaterial wie beschichtetes Glas oder aminiertes Polypropylen verwendet wurde (Skena *et al.*, 1995). Zudem erleichtert das feste Trägermaterial die Konstruktion kleinster Hybridisierungskammern und die Automatisierung des gesamten Herstellungs- und Detektionsprozesses. Außerdem kann es bei flexiblen Oberflächen dazu kommen, dass das gespottete Material sich so weit ausdehnt, dass es einerseits zu einer Kontamination mit den benachbarten Spots kommen kann und andererseits keine exakte Aussage über Signal-zu-Hintergrundverhältnis gemacht werden kann (Haab *et al.*, 2001; Lüking *et al.*, 1999; Templin *et al.*, 2003). Zusätzlich kam es mit der Entwicklung neuer Oberflächen zu einer verbesserten Immobilisierung der Moleküle an den Oberflächen.

Aufgrund der Erfolge der analytischen Studien mit Hilfe der DNA-Microarraytechnologie lag der Versuch der Etablierung der Protein-Microarraytechnologie für funktionelle Studien nahe. Bei der Etablierung dieser Technologie müssen jedoch viele Aspekte berücksichtigt werden.

DNA ist leicht zu extrahieren, relativ unempfindlich und somit ein vergleichsweise leicht zu handhabendes Probenmaterial, während das Exprimieren und das Isolieren von Proteinen, sowie das Aufrechterhalten der Funktionalität von Proteinen problematisch sind. Des

weiteren unterscheiden sich DNA und Proteine in ihrem Aufbau und ihrer Komplexität. Die DNA ist relativ einfach und einheitlich aufgebaut und besteht aus vier variablen Bausteinen, den Nukleotiden. Nukleinsäuren sind hydrophil und wegen der Phosphatgruppen im Zuckerrückgrat negativ geladen. Proteine dagegen bestehen aus 20 variablen Bausteinen, den Aminosäuren. Aufgrund dieser unterschiedlich aufgebauten Säuren und der variierenden Zusammensetzung der Aminosäuren bei den einzelnen Proteinen, können hier diverseste Moleküle gebildet werden, die sich in Struktur und Ladung stark voneinander unterscheiden können. Proteine können somit u.a. hydrophil oder hydrophob sowie basisch (positiv geladen) oder sauer (negativ geladen) sein.

Die Berücksichtigung dieser Aspekte macht offensichtlich, dass für die Immobilisierung von Nukleinsäuren eine einheitliche Arrayoberfläche ausreichend ist, um optimale Bindungsbedingungen mit höchster Bindungskapazität zu erreichen. Bei den Proteinen dagegen wird deutlich, dass die Wahl des geeigneten Oberflächenmaterials wesentlich anspruchsvoller ist. Die Oberflächen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: planare, zweidimensionale und in räumliche, dreidimensionale Oberflächen.

1.4.2 Oberflächen

Zur ersten Kategorie gehören die planaren, nicht-gelbeschichteten Microarrays, deren Glasoberfläche mit unterschiedlichen Chemikalien modifiziert wurde. Dazu gehören u.a. Aldehyd- (MacBeath und Schreiber, 2000), Epoxy- (Angenendt *et al.*, 2003b), nickelbeschichtete (MacBeath und Schreiber, 2000) und poly-L-Lysin-Oberflächen (Ge, 2000; Snappyan *et al.*, 2003).

Die dreidimensionalen Microarrays dagegen weisen eine gelbeschichtete Oberfläche, wie Polyacrylamid (Arenkov *et al.*, 2000) oder Agarose (Afanassiev *et al.*, 2000) auf. Hierzu gehören auch die, in dieser Arbeit verwendeten FASTTM-Slides von Schleicher & Schuell; diese haben eine Nitrozellulose ähnliche Oberfläche.

Dreidimensionale Microarrays haben im Vergleich zu den nicht-gelbeschichteten Microarrays eine höhere Kapazität, um die Proteine zu immobilisieren. Die Microarrays ermöglichen eine einheitliche Verteilung der Feuchtigkeit, was die Proteindenaturierung verringert. Dies wiederum kann die Funktionalität und die Aktivität der gespotteten Proteine positiv beeinflussen (Angenendt *et al.*, 2002).

1.4.3 Detektion

Neben der direkt markierten Detektion gibt es noch die markierungsfreie Detektion. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der markierten Detektion gearbeitet wurde, wird im Folgenden nur auf diese detaillierter eingegangen. Zusammenfassungen der markierungsfreien Detektion sind in Glökler und Angenendt 2003 und Zhu *et al.* 2003b zu finden.

Bei der markierten Detektion können die Interaktionspartner entweder direkt markiert oder mit spezifisch markierten Antikörpern detektiert werden. Für die direkte Markierung werden häufig fluoreszierende Farbstoffe (z.B. Cy3 und Cy5) eingesetzt. Diese sind leicht in der Handhabung, extrem sensitiv und ermöglichen eine Auswertung in hoher Spotdichte (Haab *et al.*, 2001; Templin *et al.*, 2002). Eine weitere fluoreszenzbasierte Detektion ist die *rolling circle amplification* (RCA) (Kingsmore und Patel, 2003; Schweitzer *et al.*, 2002). Hier wird der Detektionsantikörper mit einem DNA-Primer markiert. Nachdem der Antikörper an den immobilisierten Interaktionspartner gebunden hat, findet in Anwesenheit von fluoreszierenden Nukleotiden, DNA-Polymerase und einer zirkulären DNA eine sich im Kreis drehende Replikation statt. Die Fluoreszenz, die anschließend gemessen werden kann, ist direkt proportional zu der Menge der spezifischen Proteine in der Originalprobe (Schweitzer *et al.*, 2002). Diese Methode ist äußerst sensitiv. Aber auch andere sensitive Detektionsmethoden sind zu erwähnen, wie z.B. Radioaktivität (MacBeath und Schreiber, 2000; Zhu *et al.*, 2000).

Die Detektion unter Verwendung spezifisch markierter Antikörper wurde als erstes eingesetzt, um Proteine auf Filterarrays (Büssow *et al.*, 1998; Joos *et al.*, 2000) sowie Glassarrays (Guschin *et al.*, 1997) zu detektieren.

Im wesentlichen gibt es hier drei Strategien für die Detektion:

Beim direkten Immunoassay werden die Proteine als Akzeptormoleküle direkt auf der Oberfläche immobilisiert und mit Hilfe der Interaktion mit einem markierten Detektionsantikörper sichtbar gemacht.

In Gegensatz zum ersten Assay werden beim Antigen capture Immunoassay die Antikörper als Akzeptormoleküle auf der Oberfläche immobilisiert und die Proteine, die eine Interaktion mit den Antikörpern eingehen, sind direkt markiert.

Beim Sandwichimmunoassay werden ebenfalls die Antikörper als Akzeptormoleküle auf die Oberfläche gebracht, anschließend werden die Proteine gebunden und diese Bindung kann dann mit einem zweiten markierten Detektionsantikörper gezeigt werden.

1.4.4 Analytische und funktionelle Protein-Microarrays

Hinsichtlich der Anwendung von Protein-Microarrays unterscheidet man zwischen analytischen Protein-Microarrays und funktionellen Protein-Microarrays.

Bei den analytischen Protein-Microarrays werden entweder die Antigene oder die Antikörper in hoher Dichte auf der Oberfläche immobilisiert und z.B. zur Ermittlung der Existenz und der Konzentration von Antikörpern bzw. Antigenen in komplexen Lösungen, wie Serum, eingesetzt. Basierend auf Serum-*screening* Versuchen können so z.B. diagnostische Proteinmarker identifiziert werden (Cahill, 2001; Glökler und Angenendt, 2003; Petricoin *et al.*, 2002a; Petricoin *et al.*, 2002b; Walter *et al.*, 2002). Des Weiteren können die Antigen-Microarrays eingesetzt werden, um die Spezifität bzw. Kreuzreaktivität von Antikörpern zu bestimmen (Kersten *et al.*, 2003; MacBeath und Schreiber, 2000; Michaud *et al.*, 2003).

Für funktionelle Protein-Microarrays wird eine große Anzahl an aufgereinigten, rekombinanten und vorzugsweise nativen Proteinen von einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus auf der Oberfläche immobilisiert. Diese Arrays können verwendet werden, um eine Wechselwirkung der immobilisierten Proteine mit anderen Proteinen (MacBeath und Schreiber, 2000; Zhu *et al.*, 2001), DNA (Ge, 2000; Kersten *et al.*, 2004b; Snapyan *et al.*, 2003), kleinen Molekülen (Burton und McGehee, 2004; MacBeath und Schreiber, 2000; Zhu *et al.*, 2001) oder die Modifikation der Proteine durch Enzyme (Arenkov *et al.*, 2000; MacBeath und Schreiber, 2000; Zhu *et al.*, 2000, Kramer *et al.*, 2004) zu identifizieren.

1.5 Phosphorylierung als eine posttranslationale Proteinmodifikation

Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine wichtige posttranslationale Proteinmodifikation. Dabei erfolgt die Übertragung eines negativ geladenen γ -Phosphatrestes eines Phosphatgruppendonors (meist Adenosin- und in seltenen Fällen Guanosintriphosphat) auf eine der Akzeptoraminosäuren. Durch Phosphorylierungen kann es zu Konformationsänderungen der Polypeptidketten und somit zu einer Veränderung der Proteineigenschaften kommen. Der Vorgang ist reversibel.

Phosphorylierungen sind wesentlich an der Kontrolle von intrazellulären Prozessen in Eukaryonten, wie Stoffwechsel, Transkription, Translation, Zellteilung und Zellwachstum sowie Membrantransport und Signalübertragung beteiligt. Sehr häufig reguliert die Phosphorylierung die Aktivität von Enzymen. Darüber hinaus kann die Interaktionsfähigkeit

mit anderen Proteinen, DNA sowie die Lokalisation von Proteinen in der Zelle beeinflusst werden.

Die Stärke und Dauer der Phosphorylierung der Proteine wird einerseits durch die Proteinkinasen, welche die Phosphatreste übertragen und andererseits durch die Proteinphosphatasen, welche die Phosphorsäureester-Bindungen hydrolysieren, reguliert.

Es gibt zwei Gruppen von Kinasen, die über ihre Lokalisation definiert werden: Rezeptorkinasen, welche sich in der Membran befinden und zytosolische Proteinkinasen, welche sich frei im Zytosol bewegen.

Die Unterteilung der Proteinkinaseklassen kann nach ihren Akzeptoraminosäuren in Serin/Threonin-, Tyrosin-, Histidin/Arginin/Lysin-, Cystein- und Aspartat/Glutamat-Kinasen erfolgen. Während in den Prokaryonten die Phosphorylierung an Histidinresten überwiegt, werden in den Eukaryonten fast ausschließlich Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen beobachtet (Kerk et al, 2002; Luan, 1998). In Pflanzen sind bisher hauptsächlich Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen identifiziert worden (Hardie, 1999; Mundy und Schneitz, 2002).

Die herausragende Bedeutung der Kinasen wird durch den hohen Anteil von Proteinkinasegenen im eukaryontischen Genom verdeutlicht. In *S. cerevisiae*, *C. elegans* und in *D. melongaster* gehören Proteinkinasen zu den Proteinklassen mit den häufigsten Vertretern. Es wird angenommen, dass durchschnittlich 2% aller eukaryotischen Gene dieser drei Organismen für Proteinkinasen codieren (Lander et al., 2001; Rubin et al., 2000). Champion et al. 2004 gehen davon aus, dass etwa 4% des *Arabidopsis* Genoms Serin/Threonin-Proteinkinasen repräsentiert.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Phosphorylierungsspezifität von MAP-Kinasen untersucht wurde, wird im weiteren Verlauf der Arbeit nur auf diese Familie der Kinasen detaillierter eingegangen. Umfassende Zusammenfassungen aller Familien der pflanzlichen Proteinkinasen sind in Champion et al., 2004 und Hardie, 1999 zu finden.

1.5.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)

Bei den MAP-Kinasen erfolgt die Übertragung des Phosphatrestes über eine Kaskade. Beim Übergang von einem Element zum nächsten, kann es zu einer Verstärkung des Signals kommen. Wirken einige Signale auf mehrere Zielproteine, kann es zu einer Verzweigung der Übertragungswege kommen, wodurch sich die Vielfalt der Reaktionsmöglichkeiten, ausgehend von dem ursprünglichen Reiz, erhöhen kann.

MAP-Kaskaden sind sowohl bei der Signalübertragung verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren, wie Temperatur- oder Trockenheitsstress, Pathogeninfektion und

Verwundung als auch bei der Weitergabe von Pflanzenhormonen, wie Ethylen, Abszinsäure und Auxin beteiligt (Jonak *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002; Tena *et al.*, 2001). MAP-Kinasen versetzen die Zelle in die Lage, auf Änderungen in der extrazellulären Umgebung zu reagieren (Abb. 1.2). Dabei führt die Bindung der Signalmoleküle an membranständige Rezeptoren zu deren Konformationsänderung, wodurch das Signal über die intrazelluläre Domäne in das Zellinnere gelangt. Die anschließende Signalübertragung zum Zellkern erfolgt dann in der Regel über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade (Asai *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2002; Tena *et al.*, 2001). Dabei phosphoryliert eine Serin/Threonin-Proteinkinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase, MAPKKK) eine nachfolgende dualspezifische Kinase (MAPKK), die wiederum eine MAP-Kinase (MAPK) aktiviert. Es kommt nur zu einer Aktivierung der MAPK, wenn sowohl ein Threonin- als auch das Tyrosinrest in der „Aktivierungsschleife“ durch die MAPKK phosphoryliert wird (Keyse, 2000; Nühse *et al.*, 2000). Diese Reste in der „Aktivierungsschleife“ (Hardie, 1999; Tena *et al.*, 2001; Zhang und Klessig, 2001) sind nur durch eine Aminosäure (Thr-X-Tyr) voneinander getrennt.

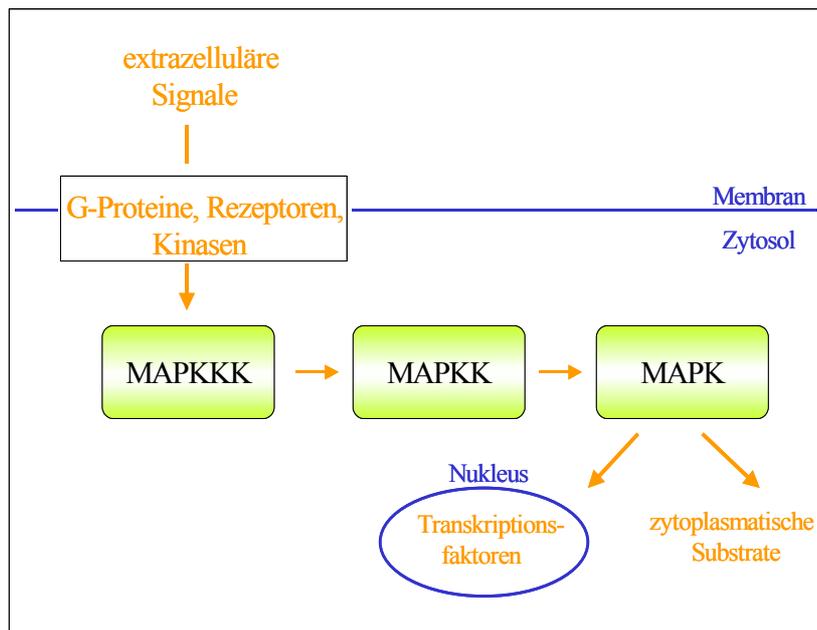


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des MAP-Kinasen Signalweges.

Die MAP-Kinase steht am Ende verschiedener Signaltransduktionsketten, die Wachstums- und Differenzierungssignale durch Phosphorylierung von der Plasmamembran zum Kern weiterleiten. Über die Substrate der MAP-Kinasen ist erst wenig bekannt. Substrate, welche die MAP-Kinasen *in vitro* phosphorylieren, könnten Aufschluss über eine mögliche

Funktion dieser Kinasen im Zellzyklus geben. Aktivierte MAP-Kinasen können beispielsweise in den Zellkern gelangen und dort Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit deren DNA Bindung regulieren. Somit stellt die MAP-Kinase eine Verbindung zwischen Zytosol und Nukleus dar, indem es durch extrazelluläre Stimulation zu einer Änderung in der Genexpression kommen kann.

MAPKgroup 2002 beschreiben bei *Arabidopsis* die Existenz von bisher 20 MAPKs, (MPKs) 10 MAPKKs und 60 MAPKKKs.

Die MPKs werden in vier Gruppen unterteilt (A-D), wobei aufgrund von Sequenzvergleichen innerhalb der Konsensussequenz die MPKs aus zwei Übergruppen bestehen. Die eine Übergruppe (Gruppen A - C) weist an der Phosphorylierungsstelle das Aminosäuremotiv TEY (Threonin-Glutamat-Tyrosin) und die andere Übergruppe (Gruppe D) das Motiv TDY (Threonin-Asparagat-Tyrosin) auf.

Bei den pflanzlichen MAPKKs besteht die Phosphorylierungsstelle aus dem Aminosäuremotiv T/SxxxxTS und unterscheidet sich von den tierischen Aminosäuremotiv: T/SxxxTS (MAPKgroup, 2002).

Die Regulation der MAPKKK ist dagegen deutlich komplexer, da es hier eine große Anzahl von regulatorischen Motiven gibt, z.B. Bindestellen für GTP-bindende Proteine oder Serin/Threonin- und Tyrosin Phosphorylierungsstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die *Arabidopsis thaliana* MPK3 und MPK6 verwendet. Beide MAP-Kinasen gehören zu der Gruppe A, d.h. bei beiden besteht die Phosphorylierungsstelle aus dem Aminosäuremotive TEY. Die Kinasen dieser Gruppe sind überwiegend an Signalübertragungen beteiligt, die durch Änderungen der Umweltbedingungen und des Hormonhaushaltes ausgelöst werden.

1.6 Zielsetzung

Mit dem zunehmenden Wissen über die DNA-Information (Genomics) von immer mehr Lebewesen, steigt auch das Interesse an der Untersuchung der Genfunktionen durch Anwendung funktioneller Proteomstudien. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu eine relativ neue Proteomics-Technologie, die Protein-Microarraytechnologie gewählt. Diese Technologie erlaubt es, funktionelle Studien miniaturisiert und parallelisiert durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Protein-Microarraytechnologie angewandt werden, um erste funktionelle Analysen von *Arabidopsis thaliana*-Proteinen im hohen Durchsatz durchzuführen. Das setzt die Expression rekombinanter *Arabidopsis thaliana*-Proteine voraus, so dass sich für diese Arbeit zwei Teilziele ergaben:

1. Expression von *Arabidopsis thaliana*-Proteinen nach cDNA-Klonierung
2. nachfolgende Analyse dieser Proteine unter Verwendung von Protein-Microarrays

Zu Gewinnung rekombinanter Proteine von *Arabidopsis thaliana* im Hochdurchsatz wurden zwei Gewebe als interessante Untersuchungsobjekte ausgesucht, Pistill und Infloreszenz. Aus beiden sollten, ausgehend von den entsprechenden mRNAs, die cDNAs synthetisiert, im Hochdurchsatz kloniert und damit zwei unterschiedliche cDNA-Bibliotheken konstruiert werden. Die Konstruktion der Pistill cDNA-Bibliothek sollte in einem GATEWAY-Entryvektor erfolgen. Mit diesem System besteht die Möglichkeit, Gene mittels gerichteter Rekombination in unterschiedliche Expressions- und Analysesysteme zu transferieren. Dagegen sollte die Infloreszenz cDNA-Bibliothek direkt in einen *E. coli* Protein-Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Vektor ermöglicht die Hochdurchsatzexpression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen RGS His₆-Tag. Die potentiellen Expressionsklone dieser neu gewonnenen cDNA-Bibliothek sollten, unter Verwendung von Hochdichte-Proteinfiltern, sogenannten Protein-Macroarrays, ermittelt und in einer Proteinexpressions-Unterbibliothek neu angeordnet werden. Basierend auf den Sequenzinformationen der Proteinexpressions-Unterbibliothek sollte ein Uniklonset erstellt werden, in dem jeder Klon möglichst nur einmal vorläge. Die Proteine dieses Uniklonsets sollten exprimiert und aufgereinigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten alle *Arabidopsis*-Proteine des neu zusammengestellten Uniklonsets in einer ersten funktionellen Studie auf Protein-Microarrays verwendet werden, um potentielle Phosphorylierungs-Targets von zwei interessanten *Arabidopsis*-MAP-Kinasen, MPK 3 und 6, zu identifizieren. Dazu sollten die Proteine auf Microarrays angeordnet werden. Ein Nachweis der exprimierten Proteine auf den Protein-Microarrays

sollte mit Hilfe eines anti-RGS His₆-Antikörpers durchgeführt werden. Auch die eigentlichen *in vitro* Phosphorylierungsstudien sollten auf diesen Microarrays stattfinden. Zu diesem Zwecke sollte zunächst ein Quantifizierungssystem zur statistischen Analyse der Microarrays nach Phosphorylierung etabliert werden. Dieses Quantifizierungssystem sollte der Identifizierung potentieller Targets der beiden MAP-Kinasen dienen. Die identifizierten potentiellen Phosphorylierungs-Targets sollten in einem unabhängigen *in vitro* Testsystem, mittels Phosphorylierungen auf PVDF-Membranen verifiziert werden.

Mit dem etablierten Phosphorylierungs-Assay sollte eine erste funktionelle Studie mit *Arabidopsis thaliana*-Proteinen unter Verwendung von Protein-Microarrays, mit dem in dieser Arbeit erstellten Uniklonsets, erfolgen.