

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der ZKS-Gene

Für die Durchführung der Experimente war es zunächst erforderlich, die kodierenden Sequenzen der ZKS-Gene zu klonieren. Dies geschah durch Amplifikation der cDNAs per PCR aus verschiedenen cDNA-Banken (Kapitel 2.5.19) oder per RT-PCR aus Gesamt-RNA-Extrakten aus verschiedenen Geweben aus *A. thaliana* (Kapitel 2.5.8). Die amplifizierten cDNA-Segmente wurden mittels der GATEWAY- und TOPO-Klonierung (Kapitel 2.5.16.1 und Kapitel 2.5.16.2) in die GATEWAY-kompatiblen *Entry*-Vektoren pENTR oder pDONR (Kapitel 2.3) kloniert. Insgesamt 25 Gene konnten auf diese Weise in die *Entry*-Vektoren kloniert werden. Für das *Yeast Two-Hybrid* System werden Proteine benötigt, die keine Transmembran-Domänen enthalten. Für die Rezeptoren wurden aus diesem Grund nur die cytoplasmatischen Domänen kloniert, die mittels des Computerprogramms „SMART“ (Letunic *et al.*, 2004) ermittelt wurden. Zur Überprüfung der Identitäten wurden die klonierten cDNA-Segmente durch- bzw. ansequenziert (Kapitel 2.5.18).

In Tabelle 17 sind die Klonierungs- und Sequenzierungsergebnisse zusammengefasst. Die für die cytoplasmatischen Domänen kodierenden Abschnitte der drei Cytokininrezeptorgene *AHK2*, *AHK3* und *AHK4* konnten in die *Entry*-Vektoren kloniert werden (Tabelle 17). Darüber hinaus wurden die cytoplasmatischen Domänen der beiden Rezeptorgene *ETR1* und *AHK1* kloniert (Tabelle 17), um die Spezifität der für die Cytokininrezeptoren gefundenen Interaktionen zu untersuchen. Diese wurden ausgewählt, da sowohl für *ETR1* als auch für *AHK1* Interaktionen mit einigen der hier untersuchten ZKS-Proteine – *ETR1-AHP1/2/3* (Urao *et al.*, 2000) und *AHK1-AHP2* (Urao *et al.*, 2000) – publiziert wurden und somit eine potentielle Verknüpfung der Cytokininsignaltransduktion mit der Ethylen- und der Osmosignaltransduktion nahegelegt wurde. Von den fünf Histidinphosphotransmittern konnten vier, *AHP1*, *AHP2*, *AHP3* und *AHP5*, in die *Entry*-Vektoren kloniert werden (Tabelle 17). Von den insgesamt 21 Responseregulatorgenen konnten 15, nämlich neun Typ-A und sechs Typ-B *ARR*-Gene, kloniert werden (Tabelle 17). Darüber hinaus wurde auch die für den N-terminus kodierende Sequenz des Rotlichtrezeptorgens *PhyB* kloniert, da für das *PhyB*-Protein eine Interaktion mit dem Typ-A Responseregulator *ARR4* publiziert wurde (Sweere *et al.*, 2001) und somit als weitere Positivkontrolle dienen sollte.

Für fünf der noch neun fehlenden ZKS-Gene wurden cDNA-Amplifikate hergestellt. Diese konnten allerdings nicht in die *Entry*-Vektoren kloniert werden. In Tabelle 18 sind die RNA-Extrakte und die cDNA-Banken aufgeführt, die getestet und aus denen die cDNA-Amplifikate

erhalten wurden. Darüber hinaus wurden verschiedene Anbieter von cDNA-Klonen und EST-Datenbanken (RIKEN, <http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/>; ABRC, <http://www.arabidopsis.org/abrc/>; SIGnAL, <http://signal.salk.edu/>) auf das Vorhandensein der in Tabelle 18 aufgeführten fehlenden ZKS-Gene durchmustert, allerdings ohne Erfolg.

Tabelle 17. Klonierte und sequenzierte ZKS-Gene.

cDNA-Bank	Gen	Entry-Vektor	cDNA-Länge	Sequenzierte Nukleotide	Aminosäureaustausch
Minet	<i>ETR1</i>	pDONR201	1215 bp	1-443 / 727-1215	M289L,T304M,I387M
Minet	<i>AHK1</i>	pDONR201	2157 bp	1-568 / 1603-2157	Y596H,R627L
Minet	<i>AHK2</i>	pENTR/D-TOPO	1800 bp	1-640 / 1179-1800	Kein
Minet	<i>AHK3</i>	pDONR222	1782 bp	1-1782	Kein
Minet	<i>AHK4</i>	pDONR201	1854 bp	1-656 / 1239-1854	Kein
Minet	<i>AHP1</i>	pDONR201	465 bp	1-465	Kein
Minet	<i>AHP2</i>	pDONR201	471 bp	1-471	Kein
Minet	<i>AHP3</i>	pENTR/D-TOPO	468 bp	1-468	Kein
-	<i>AHP4</i>	-	384 bp	-	-
Samen	<i>AHP5</i>	pENTR/D-TOPO	474 bp	1-337	Q111H
Minet	<i>ARR1</i>	pDONR201	2010 bp	1-2010	Kein
Minet	<i>ARR2</i>	pDONR201	1995 bp	1-681 / 1398-1995	S62I,N661H
Minet	<i>ARR10</i>	pENTR/D-TOPO	1659 bp	1-444 / 1024-1659	Kein
Minet	<i>ARR11</i>	pENTR/D-TOPO	1335 bp	1-520 / 992-1335	D58E,I382N
-	<i>ARR12</i>	-	1722 bp	-	-
-	<i>ARR13</i>	-	1728 bp	-	-
Samen	<i>ARR14</i>	pENTR/D-TOPO	1149 bp	1-1149	R172W,N356S
-	<i>ARR18</i>	-	1899 bp	-	-
-	<i>ARR19</i>	-	1827 bp	-	-
Samen	<i>ARR20</i>	pENTR/D-TOPO	1281 bp	1-501 / 750-1281	Kein
-	<i>ARR21</i>	-	1866 bp	-	-
Minet	<i>ARR3</i>	pDONR201	696 bp	1-696	A186S,P224S
Minet	<i>ARR4</i>	pDONR201	780 bp	1-780	G5R
Samen	<i>ARR5</i>	pENTR/D-TOPO	555 bp	1-555	D163N
Minet	<i>ARR6</i>	pDONR201	561 bp	1-561	Kein
Minet	<i>ARR7</i>	pDONR201	621 bp	1-621	I186V
Minet	<i>ARR8</i>	pENTR/D-TOPO	678 bp	1-280	Kein
Minet	<i>ARR9</i>	pENTR/D-TOPO	705 bp	1-705	T56I
Samen	<i>ARR15</i>	pENTR/D-TOPO	621 bp	1-621	Kein
Samen	<i>ARR16</i>	pENTR/D-TOPO	495 bp	1-495	Kein
-	<i>ARR17</i>	-	462 bp	-	-
Samen	<i>PhyB</i>	pDONR201	522 bp	1-522	Kein

Erläuterungen zur Tabelle: cDNA-Bank, Quelle aus denen die ZKS-Gene amplifiziert und kloniert wurden. Einzelheiten zu den cDNA-Banken sind dem Kapitel 2.5.19 zu entnehmen.

Tabelle 18. PCR- bzw. RT-PCR Produkte der noch fehlenden ZKS-Gene.

Gene	RT-PCR Produkte aus RNA-Extrakten			PCR Produkte aus cDNA-Banken					
	Keimlinge	Primärblätter	Blüten	Hormon	Blüten	Keimlinge	Samen	Koncz	Minet
<i>AHP4</i>	-	-	Ng	+	+	Ng	+	+	+
<i>ARR12</i>	-	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng	+
<i>ARR13</i>	Ng	Ng	-	-	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng
<i>ARR17</i>	Ng	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>ARR18</i>	-	+	-	+	Ng	Ng	+	Ng	Ng
<i>ARR19</i>	Ng	Ng	-	-	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng
<i>ARR21</i>	Ng	Ng	Ng	-	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng

Abkürzungen: +, cDNA-Amplifikat vorhanden; -, cDNA-Amplifikat nicht vorhanden; Ng, Nicht getestet.

3.2 Ergebnisse des Matrix-Ansatzes

3.2.1 Autoaktivierungstest der ZKS-Proteine

Die klonierten ZKS-Gene (Kapitel 3.1) wurden im Anschluss an die Sequenzierung per LR-Rekombination (Kapitel 2.5.16.1) aus den *Entry*-Vektoren in die *Bait*- und *Prey*-Expressionsvektoren pBTM116-D9-GW und pACT2-GW (Kapitel 2.3) kloniert und auf ihre Verwendbarkeit im *Yeast Two-Hybrid* System untersucht. Hierzu wurden alle ZKS-Proteine im *Bait*-Vektor als LexA-DBD-Fusionsproteine gemeinsam mit der GAL4-AD, das durch den *Prey*-Vektor pACT2-GW-Leer (Kapitel 2.3) kodiert wird, und auch umgekehrt im *Prey*-Vektor als GAL4-AD-Fusionsproteine gemeinsam mit der LexA-DBD, das durch den *Bait*-Vektor pBTM116-D9-GW-Leer (Kapitel 2.3) kodiert wird, in *S. cerevisiae* exprimiert. Im Idealfall sollten die ZKS-Proteine weder als *Bait*- noch als *Prey*-Fusionsproteine die Reportergene aktivieren und somit kein Wachstum des Hefeklons auf Interaktionsmedium ermöglichen. Diejenigen ZKS-Proteine, die die Reportergene aktivieren, werden als Autoaktivierer bezeichnet. Unter den als *Bait*-Fusionsprotein exprimierten ZKS-Proteinen erwiesen sich die Rezeptoren ETR1 und AHK1, die Histidinphosphotransmitter AHP1, AHP2, AHP3 und AHP5 und die Typ-B Responseregulatoren ARR1, ARR11, ARR14 und ARR20 als Autoaktivierer (Abbildung 4A). Die als *Bait*-Fusionsproteine exprimierten Typ-A ARRs (Abbildung 4A) und die als *Prey*-Fusionsproteine exprimierten ZKS-Proteine (Abbildung 4B) zeigten keine Autoaktivierung.

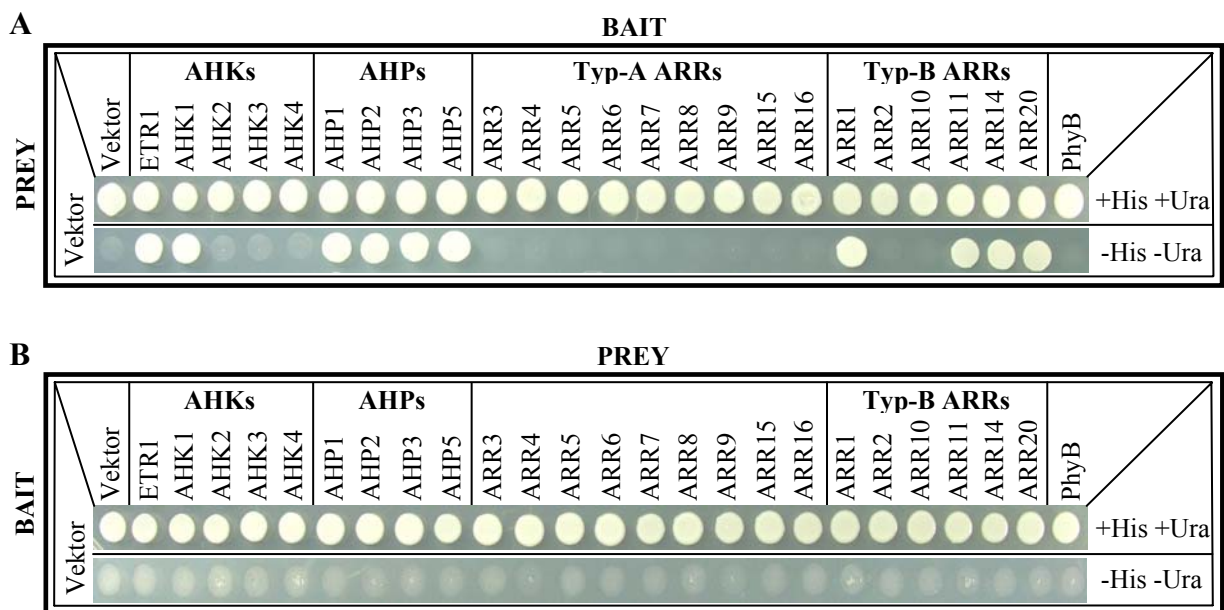


Abbildung 4. Autoaktivierungstest der ZKS-Proteine. Die ZKS-Proteine wurden (**A**) als *Bait* gemeinsam mit dem leeren *Prey*-Vektor und umgekehrt (**B**) als *Prey* gemeinsam mit dem leeren *Bait*-Vektor in *S. cerevisiae* exprimiert. Jeweils 10 µL der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Kontrollmedium (+His +Ura) und auf Interaktionsmedium (-His -Ura) aufgetragen.

3.2.2 Unterdrückung der Autoaktivierung

Die in *Bait*-Orientierung identifizierten Autoaktivierer wurden auf Interaktionsmedium überführt, das mit verschiedenen Konzentrationen an 3-AT versetzt war. 3-AT inhibiert das in diesem System durch das *HIS3*-Reporter gen kodierte Protein (Hilton *et al.*, 1965; Klopotoski und Wiater, 1965; Wiater *et al.*, 1971) und kann somit im *Yeast Two-Hybrid* zur Unterdrückung schwacher Autoaktivierer verwendet werden. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, bei welcher 3-AT Konzentration sich die Autoaktivierung der *Baits* unterdrücken lässt.

Unter den zehn autoaktivierenden ZKS-Proteinen erwiesen sich fünf, die Rezeptoren ETR1 und AHK1, der Histidinphosphotransmitter AHP5 und die beiden Responseregulatoren ARR1 und ARR14, als schwache Autoaktivierer und konnten mittels 5 mM 3-AT unterdrückt werden (Abbildung 5). Die restlichen fünf Autoaktivierer, die drei Histidinphosphotransmitter AHP1, AHP2, AHP3 und die beiden Responseregulatoren ARR11 und ARR20, erwiesen sich als starke Autoaktivierer und konnten auch bei 20 mM 3-AT nicht unterdrückt werden.

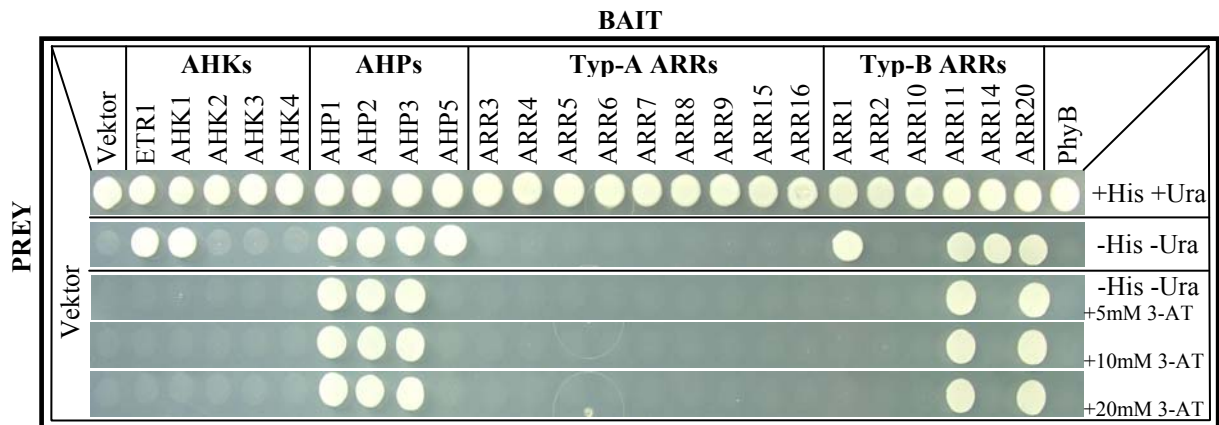


Abbildung 5. Autoaktivierungstest der ZKS-Proteine. Autoaktivierende ZKS-Proteine wurden als *Bait* gemeinsam mit dem leeren *Prey*-Vektor in *S. cerevisiae* exprimiert. Jeweils 10 µL der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Kontrollmedium (+His +Ura), auf Interaktionsmedium (-His -Ura) und auf Interaktionsmedium mit zunehmender Konzentration an 3-AT (-His -Ura +5 mM 3-AT, -His -Ura +10 mM 3-AT und -His -Ura +20 mM 3-AT) aufgetragen.

3.2.3 Im *Yeast Two-Hybrid* System verwendbare ZKS-Proteine

In Tabelle 19 sind die ZKS-Proteine zusammengefasst, die für das *Yeast Two-Hybrid* System im Matrix-Ansatz und in den *Library-Screens* verwendet wurden.

Tabelle 19. Für das *Yeast Two-Hybrid* System verwendete ZKS-Proteine.

5 AHKs					5 AHPs					10 Typ-A ARR										11 Typ-B ARR												
E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P			
T	H	H	H	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	H			
R	K	K	K	K	P	P	P	P	P	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Y			
1	1	2	3	4	1	2	3	4	5	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	B			
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			
●	●				●	●	●		●																							
○	○								○																							
●	●	●	●	●					●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			

25x ● Kloniert und als *Bait* und *Prey* in Hefe exprimiert
 10x ● Autoaktivierende *Baits*
 20x ● *Baits*, die im Matrix-Ansatz und in den *Library-Screens* verwendet wurden
 5x ● PCR-Produkt vorhanden
 5x ○ 3-AT unterdrückte *Baits*
 25x ● *Preys*, die im Matrix-Ansatz verwendet wurden

3.2.4 Interaktionsmatrix der Proteine aus dem ZKS von *A. thaliana*

Die auf Autoaktivierung getesteten ZKS-Proteine wurden im Matrix-Ansatz in beiden Orientierungen, als *Bait* und als *Prey* verwendet. In Abbildung 6 sind die Interaktionen für AHP5 als *Bait* in einer Verdünnungsreihe beispielhaft dargestellt. Die Verdünnungsreihe dient dem Ausschluss von Hefewachstum auf toten Zellen. Kolonien, die auch nach Verdünnung der Kultur vereinzelt Kolonien auf Interaktionsmedium zeigten, wurden als potentielle Interaktionspositive bezeichnet. Für AHP5 konnten insgesamt 17 Interaktionen in *Bait*-Orientierung gezeigt werden (Abbildung 6).

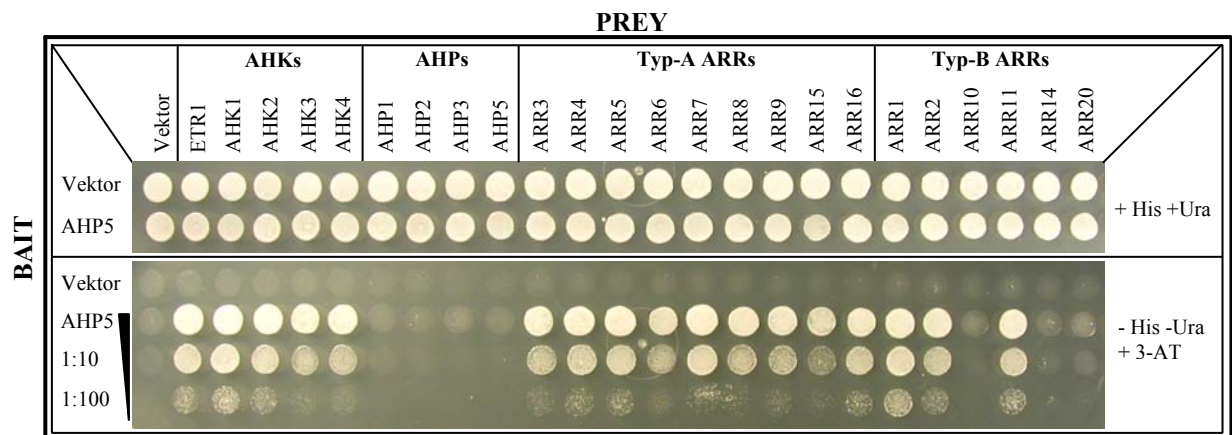


Abbildung 6. Interaktionsmatrix für AHP5 als *Bait*. AHP5 wurde als *Bait* gemeinsam mit 25 ZKS-*Preys* in *S. cerevisiae* exprimiert. Jeweils 10 µL der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Kontrollmedium (+His +Ura) und auf Interaktionsmedium mit 3-AT (5 mM) aufgetragen (-His -Ura +3-AT). Darüber hinaus wurden die Kulturen 1:10 und 1:100 verdünnt und ebenfalls auf dasselbe Interaktionsmedium aufgetragen.

20 ZKS-Baits wurden auf diese Weise mit 25 ZKS-Preys im Rastermuster auf Interaktionen untersucht (Tabelle 20). Unter den daraus resultierenden 500 Kombinationen konnten insgesamt 68 Interaktionen identifiziert werden, 43 neue und 25 bekannte. Nur drei bekannte Interaktionen konnten in diesem System nicht bestätigt werden. Unter den neuen Interaktionen wurde eine Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von AHK2 mit sich selbst (Tabelle 20), die auf eine potentielle Homodimerisierung *in planta* deutet, gefunden. Für AHK3 und AHK4 konnte in diesem System keine Selbstinteraktion gezeigt werden. Allerdings interagiert AHK3 mit den beiden Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK4. Zur Überprüfung der Spezifität dieser Interaktionen wurden die cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren ETR1 und AHK1 mit in die Interaktionsmatrix einbezogen. Die Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4 zeigten keine Interaktionen mit den Rezeptoren ETR1 und AHK1. Die potentiellen Homo- und Heterodimerisierungen unter den Cytokinin-rezeptoren sind also spezifisch. Die meisten Interaktionen konnten für die Histidinphosphotransmitter gezeigt werden. Alle vier getesteten Histidinphosphotransmitter interagieren mit den drei Cytokininrezeptoren und auch mit fast allen Typ-B und Typ-A Responseregulatoren (Tabelle 20). Die Interaktionen unter den AHPs und den ARRs ist für einige Kombinationen spezifisch. Beispielsweise interagiert der Typ-B Responseregulator ARR10 mit AHP1, AHP2 und AHP3, aber nicht mit AHP5.

Zwischen den beiden ARR Typen konnten keine Interaktionen gezeigt werden. Eine Ausnahme bildete der Typ-B ARR ARR14, der sowohl mit sich selbst als auch mit einem anderen Typ-B ARR, nämlich ARR2, interagiert (Tabelle 20). Darüber hinaus interagiert ARR14 mit AHK2.

Nur drei bekannte Interaktionen konnten in diesem System nicht bestätigt werden. Dies sind die Interaktionen AHK1-AHP2 (Urao *et al.*, 2000) und die Interaktionen AHP1/AHP2-ARR10 (Imamura *et al.*, 1999). Weitere vier bekannte Interaktionen (ARR1-AHP4, ARR2-AHP4, ARR11-AHP2, ARR22-AHP5) (Tanaka *et al.*, 2004; Imamura *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 2004) konnten nicht untersucht werden, da die entsprechenden Klone (AHP4 und ARR22) fehlten oder die Proteine in der *Bait*-Orientierung (AHP2 und ARR11) stark autoaktivierend waren (Kapitel 3.2.3) und somit nicht verwendet werden konnten.

Tabelle 20. Interaktionsmatrix der Proteine aus dem ZKS von *A. thaliana*.

BAIT → PREY ↓	AHKs						AHPs	Typ-A ARR								Typ-B ARR				PhyB	
	Vektor	ETR1	AHK1	AHK2	AHK3	AHK4	AHP5	ARR3	ARR4	ARR5	ARR6	ARR7	ARR8	ARR9	ARR15	ARR16	ARR1	ARR2	ARR10		ARR14
Vektor																					
AHKs	ETR1																				
	AHK1																				
	AHK2																				
	AHK3																				
	AHK4																				
AHPs	AHP1																				
	AHP2																				
	AHP3																				
	AHP5																				
Typ-A ARRs	ARR3																				
	ARR4																				
	ARR5																				
	ARR6																				
	ARR7																				
	ARR8																				
	ARR9																				
	ARR15																				
	ARR16																				
Typ-B ARRs	ARR1																				
	ARR2																				
	ARR10																				
	ARR11																				
	ARR14																				
	ARR20																				
PhyB																					

- 3-AT unterdrückte Baits
 - Bestätigte Interaktionen
 - Neue Interaktionen
 N - Nicht bestätigte Interaktionen

3.2.5 *In vitro* Verifizierung der im Matrix-Ansatz gefundenen neuen Interaktionen

Mittels des Matrix-Ansatzes konnten 68 Interaktionen identifiziert werden (Kapitel 3.2.4), 43 neue und 25 bekannte. Die neuen Interaktionen wurden im *in vitro* Interaktionstest (Kapitel 2.6.8) untersucht. Hierzu wurde zunächst eines der beiden Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein gemäß Kapitel 2.6.4 und Kapitel 2.6.5 überexprimiert und aufgereinigt.

Überexpression und Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen

Vorexperimente (Kapitel 2.6.4) dienten der Selektion von Klonen, die den GST-tag bzw. die GST-Fusionsproteine am stärksten exprimieren. In Abbildung 7 ist die Expression von GST-AHK4 in zwei verschiedenen *E. coli* Klonen beispielhaft dargestellt. Der Klon 2, der GST-AHK4 am stärksten exprimierte, wurde als Dauerkultur angelegt und für nachfolgende Experimente verwendet. Klone, die die cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren AHK2,

AHK3 und ETR1, die Histidinphosphotransmitter AHP1, AHP2, AHP3 und AHP5 und den Responseregulator ARR14 als GST-Fusionsproteine sowie das GST-Protein am stärksten exprimierten, wurden auf dieselbe Weise vorselektioniert.

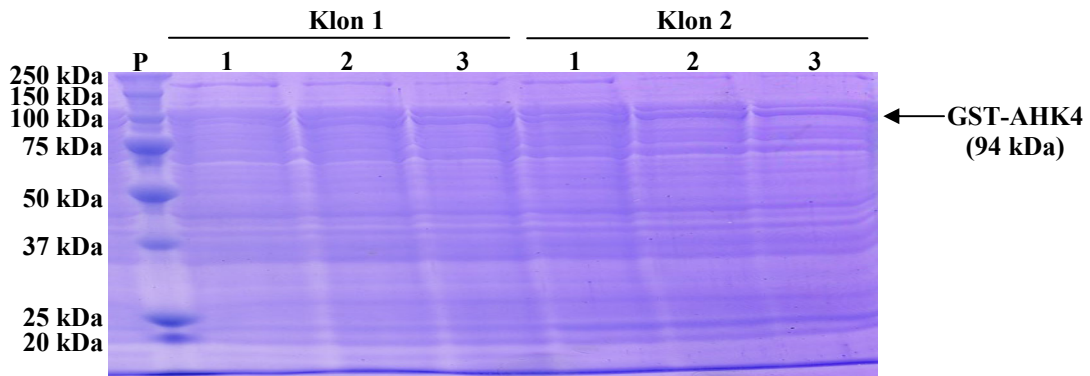


Abbildung 7. Vorexperimente zur Überexpression von GST-AHK4. Zwei verschiedene Klone wurden bei 37 °C angezogen und die Expression mit 1 mM IPTG induziert. 500 µL der Zellkultur wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten pelletiert und nach Aufschluss gelelektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt. (P) Proteinmarker, (1) Uninduzierte Probe, (2) Probe nach 2 h Induktion und (3) Probe nach 6 h Induktion.

Mittels der Vorexperimente konnte der Klon für die stärkste Proteinexpression ermittelt werden. Es konnte allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Protein nativ in löslicher Form oder denaturiert in den *inclusion bodies* vorlag. Die Aufreinigung des Proteins direkt nach der Überexpression aus dem *E. coli*-Lysat (Kapitel 2.6.4) sollte Aufschluss darüber geben, ob sich das Protein im nativen Zustand befindet, da der GST-tag nur im nativen Zustand an die Glutathion-Matrix bindet.

In Abbildung 8 ist die Aufreinigung des GST-AHK4 Fusionsproteins beispielhaft dargestellt. Darüber hinaus konnten die Rezeptoren AHK2, AHK3 und ETR1, die Histidinphosphotransmitter AHP1, AHP2, AHP3 und AHP5, der Responseregulator ARR14 und das GST-Protein ebenfalls aufgereinigt werden (Kapitel 11.4). Die aufgereinigten Proteine konnten nun im *in vitro* Interaktionstest verwendet werden.

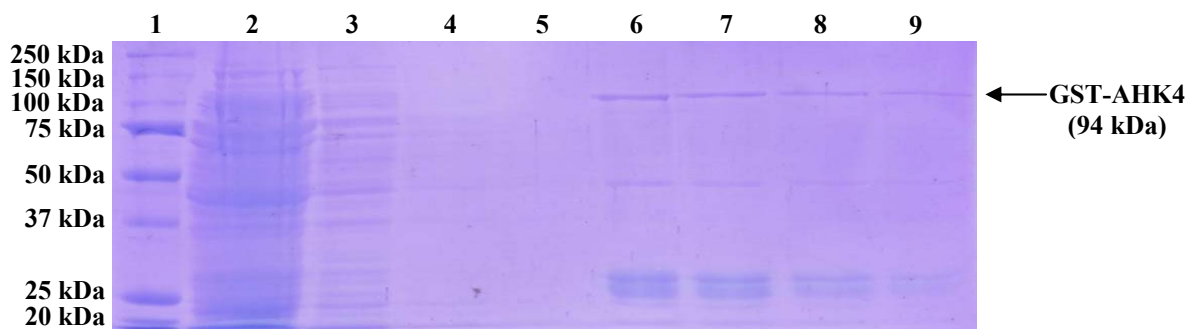


Abbildung 8. Die Aufreinigung des GST-AHK4 Fusionsproteins. Der Expressionsstamm wurde bei 30 °C angezogen und die Expression mit 1 mM IPTG induziert. (1) Proteinmarker, (2) Abzentrifugiertes Pellet nach Ultraschall-Aufschluss, (3) Überstand nach der Immobilisierung an die Glutathion-Matrix aus dem ersten, (4) zweiten und (5) dritten Waschschritt, (6) erste, (7) zweite, (8) dritte und (9) vierte spezifische Elution des Fusionsproteins von der Glutathion-Matrix.

Verifizierung der im Matrix-Ansatz gefundenen neuen Interaktionen

Die im Matrix-Ansatz gefundenen 43 neuen Interaktionen sollten durch einen *in vitro* Interaktionstest (Kapitel 2.6.8) verifiziert werden. Hierzu wurde eines der beiden Partnerproteine als GST-Fusionsprotein aufgereinigt und das andere Protein mittels eines *in vitro* Transkriptions/Translations Ansatzes radioaktiv markiert. Nach der Inkubation und den darauffolgenden Waschschrritten wurde der Ansatz autoradiographisch untersucht. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse des *in vitro* Interaktionstest für 42 der im Matrix-Ansatz gefundenen 43 neuen Interaktionen dargestellt. Die Selbstinteraktion des Osmosensors AHK1 konnte aus zeitlichen Gründen nicht untersucht werden. 38 der insgesamt 42 getesteten Interaktionen konnten mit dieser Methode verifiziert werden. Für die nicht verifizierten Interaktionen AHP1-ARR5/7/16 und AHP2-ARR5 sind die Testbedingungen möglicherweise zu stringent und müssen durch Änderung einiger Parameter, auf die im Diskussionsteil dieser Arbeit näher eingegangen wird (Kapitel 4.1), wiederholt werden.



Abbildung 9. *In vitro* Interaktionstest zur Verifizierung neuer Interaktionen. (A – C) GST-Fusionsproteine wurden an magnetische Glutathion-Kügelchen immobilisiert und mit dem ³⁵S-markierten Partnerprotein inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte die autoradiographische Detektion. (1) ³⁵S-Protein*, (2) Glutathion-Kügelchen + ³⁵S-Protein*, (3) GST an Glutathion-Kügelchen immobilisiert + ³⁵S-Protein* und (4) GST-Fusionsprotein an Glutathion-Kügelchen immobilisiert + ³⁵S-Protein*. (A) Neue Rezeptorinteraktionen, (B) neue Typ-B ARR Interaktionen und (C) neue Typ-A ARR Interaktionen.

3.2.6 Mutationsanalyse der AHP5 Interaktionen im ZKS von *A. thaliana*

Das Modell der Cytokininsignalübertragung im ZKS von *A. thaliana* sagt voraus, dass die Signaltransduktion via Phosphatübertragung erfolgt (Brandstatter und Kieber, 1998; D'Agostino *et al.*, 2000; Hwang und Sheen, 2001; Kiba *et al.*, 2002). Es ist jedoch nicht bekannt, ob der Phosphorylierungszustand der ZKS-Proteine einen Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktionen hat. Eine Mutationsanalyse sollte Aufschluss darüber geben. AHP5 zeigte im Matrix-Ansatz (Kapitel 3.2.4) die meisten Interaktionen und wurde aus diesem Grund für die Mutationsanalyse verwendet. Hierzu wurde mittels der gerichteten Mutagenese das konservierte, phosphatbindende Histidin in AHP5 gegen Lysin (H83K) oder gegen Alanin (H83A) ausgetauscht (Kapitel 2.5.17) und anschließend die mutierten AHP5-Proteine erneut auf Interaktionen untersucht (Abbildung 10). Das Interaktionsmuster blieb nach dem Aminosäureaustausch bis auf wenige Ausnahmen unverändert und führte nur bei AHK4 und ARR6 zum Interaktionsverlust. Für ARR6 war der Interaktionsverlust davon abhängig, ob das Histidin gegen Lysin oder gegen Alanin ausgetauscht wurde (Abbildung 10).

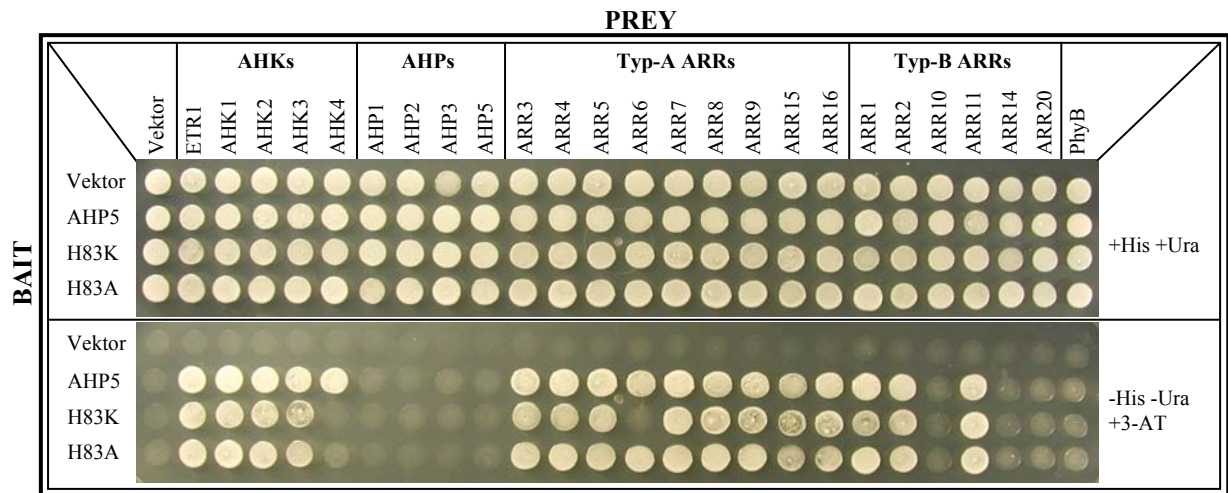


Abbildung 10. Mutationsanalyse der AHP5 Interaktionen im ZKS von *A. thaliana*. Die Aminosäure Histidin in AHP5 wurde durch gerichtete Mutagenese gegen Lysin (H83K) bzw. gegen Alanin (H83A) ausgetauscht. Die mutierten AHP5-Proteine wurden gemeinsam mit dem Wildtyp-Protein als *Bait* mit 25 ZKS-Preys in *S. cerevisiae* exprimiert. Jeweils 10 µL der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Kontrollmedium (+His +Ura) und auf Interaktionsmedium mit 5 mM 3-AT aufgetragen (-His -Ura +3-AT).

Die veränderten Interaktionseigenschaften sollten in einem zweiten, unabhängigen *in vitro* Interaktionstest verifiziert werden (Abbildung 11). Hierzu wurden die Proteine AHP5 und die mutierten Proteine AHP5 (H83K) und AHP5 (H83A), wie in Kapitel 3.2.5 für das GST-AHK4 beschrieben, in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (Kapitel 11.4). Nach der Inkubation mit den radioaktiv markierten Proteinen AHK4 und ARR6 konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur *Yeast Two-Hybrid* Analyse die Interaktionen AHP5-AHK4 und AHP5-ARR6

im *in vitro* Interaktionstest durch den Aminosäureaustausch nicht verändert werden (Abbildung 11). Die Mutationsanalyse der AHP5 Interaktionen im *Yeast Two-Hybrid* und im *in vitro* Interaktionstest zeigt, dass die Phosphorylierung des konservierten Histidins in AHP5 nicht Voraussetzung für die im Matrix-Ansatz gefundenen Interaktionen ist.

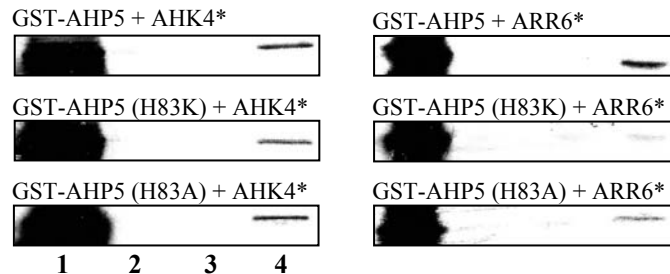


Abbildung 11. *In vitro* Verifizierung der veränderten AHP5-Interaktionen. AHP5 und die Mutantenproteine AHP5 (H83K) und AHP5 (H83A) wurden als GST-Fusionsprotein an magnetische Glutathion-Kügelchen immobilisiert und mit dem ³⁵S-markierten Partnerprotein inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem SDS-Gel erfolgte die autoradiographische Detektion. (1) ³⁵S-Protein*, (2) Glutathion-Kügelchen + ³⁵S-Protein*, (3) GST an Glutathion-Kügelchen immobilisiert + ³⁵S-Protein* und (4) GST-Fusionsprotein an Glutathion-Kügelchen immobilisiert + ³⁵S-Protein*.

3.3 Kartierung der Interaktionsdomänen für einige ZKS-Proteine

Die Kartierung der Interaktionsdomänen diente dazu, die Relevanz einzelner Domänen ausgewählter ZKS-Proteine für die gefundenen Interaktionen zu untersuchen. Das Prinzip der Kartierung der Interaktionsdomänen basiert darauf, dass Proteine in ihre funktionellen Domänen unterteilt und erneut auf Interaktionen mit ihren bekannten Partnerproteinen untersucht werden. Die Unterteilung der Proteine in ihre funktionellen Domänen erfolgte *in silico* mittels des Computerprogrammes „SMART“ (Letunic *et al.*, 2004). Für die Kartierung wurden aus jeder Proteinfamilie, nämlich AHK, AHP, Typ-B ARR und Typ-A ARR, jeweils ein Protein, für das neue Interaktionen im Matrix-Ansatz (Kapitel 3.2.4) gefunden wurden, als Vertreter ausgewählt.

Struktureller-Aufbau der für die Kartierung ausgewählten ZKS-Proteine

Die für die Interaktionskartierung ausgewählten ZKS-Proteine - AHK2, AHP5, ARR14 und ARR4 - sind mit ihren funktionellen Domänen in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Für den Cytokininrezeptor AHK2, der insgesamt 1176 Aminosäuren (AS) lang ist, zeigte die *in silico* Analyse, dass der N-terminale Bereich (AS 1-576) sich aus drei Transmembran-Domänen (TM1 AS 30-47, TM2 AS 234-251 und TM3 AS 536-558) und der CHASE-Domäne (AS 302-526) zusammensetzt. TM2 und TM3 flankieren dabei die konservierte CHASE-Domäne, die auch als potentielle Cytokinin-Bindestelle bekannt und in *Arabidopsis* für die Rezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4 spezifisch ist (Heyl und Schmülling, 2003).

Der in dieser Arbeit verwendete C-terminale cytoplasmatische Bereich (AS 577-1176) enthält die in Histidinkinasen konservierte Histidinkinase-Domäne (AS 587-867) mit der Histidinphosphorylierungsstelle im konservierten „H N G1 F G2“-Motiv. Diese Domäne setzt sich wiederum zusammen aus der HisKA-Domäne (AS 587-652) mit dem „H“-Motiv und der HATPase c-Domäne (AS 699-867) mit dem „N G1 F G2“-Motiv. Der HATPase c-Domäne in AHK2 folgt ein Bereich (AS 868-1034), der in dieser Arbeit als Domäne X bezeichnet wird. Ihr wiederum ist die *Receiver*-Domäne (AS1035-1169) mit der Aspartatphosphorylierungsstelle nachgeschaltet (Abbildung 12).

Der Histidinphosphotransmitter AHP5 ist insgesamt 157 AS lang (Abbildung 12). Die *in silico* Analyse zeigte, dass dieses Protein die HPt-Domäne (AS 37-138) trägt. Diese Domäne enthält das konservierte „XHQXKGSXS“-Motiv mit der Histidinphosphorylierungsstelle (Hwang *et al.*, 2002).

Der Typ-B Responseregulator ARR14 ist 382 AS lang und kodiert im N-terminalen Bereich für die *Receiver*-Domäne (AS 11-124) mit der Aspartatphosphorylierungsstelle und im C-terminalen Bereich für die *Output*-Domäne mit der GARP DNA-Bindedomäne (AS 202-252) (Abbildung 12), die in pflanzlichen Transkriptionsfaktoren vorkommt (Mason *et al.*, 2004; Heyl und Schmülling, 2003; Kakimoto, 2003; Hosoda *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002).

Für den Typ-A Responseregulator ARR4, der insgesamt 260 AS lang ist, zeigte die *in silico* Analyse im N-terminalen Bereich die für die Typ-A Responseregulatoren spezifische *Receiver*-Domäne (AS 34-158) mit der Aspartatphosphorylierungsstelle (Abbildung 12). Darüber hinaus besitzt ARR4 die längste C-terminale Verlängerung innerhalb der Typ-A Responseregulator Proteinfamilie.

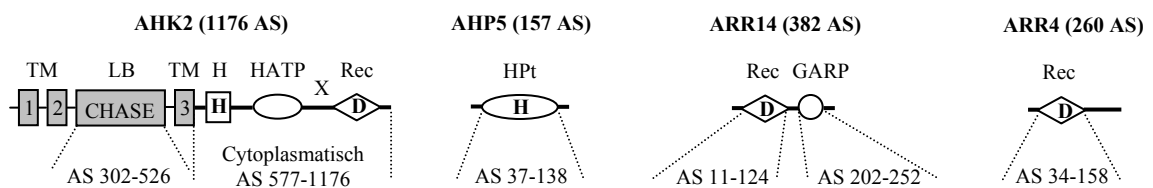


Abbildung 12. Funktionelle Domänen der für die Interaktionskartierung ausgewählten ZKS-Proteine. Die funktionellen Domänen der ZKS-Proteine AHK2, AHP5, ARR14 und ARR4 sind schematisch dargestellt. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; TM, Transmembran-Domäne; LB, Ligandenbinde-Domäne; H, HisKA-Domäne; HATP, HATPase c-Domäne; X, Domäne mit unbekannter Funktion; Rec, *Receiver*-Domäne; HPt, HPt-Domäne; GARP, DNA-Bindemotif; H, Histidin; D, Aspartat.

Unterteilung der für die Interaktionskartierung ausgewählter ZKS-Proteine in ihre funktionellen Domänen

Der *in silico* Analyse folgte die Auswahl der für die Klonierung benötigten Primer. Die PCR-Amplifikate wurden zunächst in einen *Entry*-Vektor kloniert und von dort in den *Bait*

bzw. *Prey*-Vektor des *Yeast Two-Hybrid* Systems verschoben. In Abbildung 13 sind die für die Interaktionskartierung verwendeten funktionellen Domänen des Cytokininrezeptors AHK2 (cytoplasmatischer Teil), des Histidinphosphotransmitters AHP5, des Typ-B und des Typ-A Responseregulators ARR14 und ARR4 dargestellt. Der cytoplasmatische Teil von AHK2 wurde in folgende sechs Bereiche unterteilt: HisKA+HATPase c, HisKA, HATPase c, X+Receiver, X und Receiver. AHP5 wurde unter Beibehaltung des konservierten „XHQXKGSSXS“-Motivs in einen N- und C-terminalen Bereich unterteilt, wobei beide Konstrukte weitere zehn Aminosäuren zusätzlich über dieses Motiv hinaus enthielten und zwar in Richtung C-Terminus für den N-terminalen Bereich und in Richtung N-Terminus für den C-terminalen Bereich. Für ARR14 und ARR4 wurden ebenfalls zwei Deletionskonstrukte hergestellt (Abbildung 13).

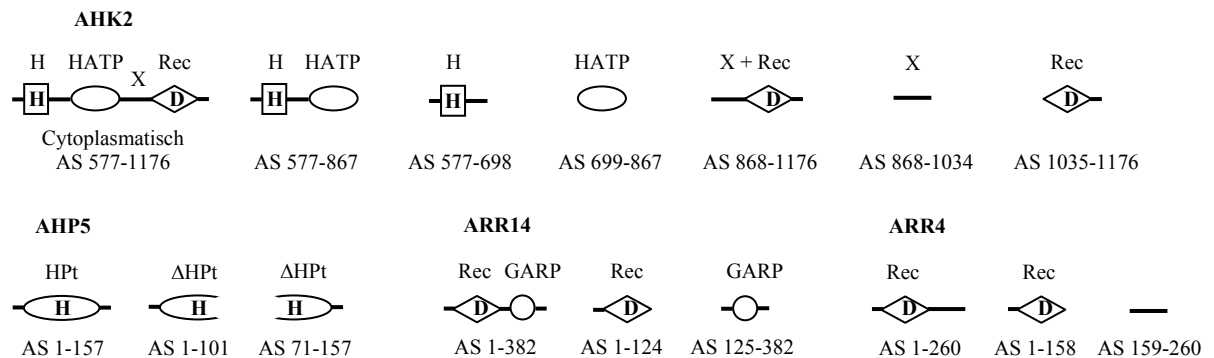


Abbildung 13. Schematische Darstellung der für die Interaktionskartierung verwendeten ZKS-Proteine und deren funktionellen Domänen. Deletionskonstrukte des Cytokininrezeptors AHK2, des Histidinphosphotransmitters AHP5, des Typ-B und Typ-A Responseregulators ARR14 und ARR4. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; H, HisKA-Domäne, HATP, HATPase c-Domäne; X, Domäne mit unbekannter Funktion; Rec, Receiver-Domäne; HPt, HPt-Domäne; ΔHPt, Deletion in der HPt-Domäne; GARP, DNA-Bindemotif; H, Histidin; D, Aminosäure Asparat.

3.3.1 Interaktionskartierung des Cytokininrezeptors AHK2

Der cytoplasmatische Bereich des Cytokininrezeptors AHK2 wurde in insgesamt sechs Domänen unterteilt (Abbildung 13) und auf Selbstinteraktion, auf Interaktion mit dem cytoplasmatischen Bereich des Rezeptors AHK3 und auf Interaktionen mit AHP5 und ARR14 untersucht (Abbildung 14). Für die Homodimerisierung des Rezeptors AHK2 konnte in *Bait*-Orientierung gezeigt werden, dass die HATPase c-Domäne autoaktivierend ist (Abbildung 14A). Aus diesem Grund zeigte auch das Fusionsprotein HisKA+HATPase c (Histidinkinase-Domäne) Autoaktivierung. Mittels 5 mM 3-AT konnte die Autoaktivierung für diese beiden Proteine unterdrückt werden, gleichzeitig wurden aber auch die Interaktionen mit AHK2 unterdrückt (ohne Abbildung). In *Prey*-Orientierung hingegen (Abbildung 14B) konnte gezeigt werden, dass die Histidinkinase-Domäne mit AHK2 interagiert. Das Kartierungsergebnis für

die Interaktion von AHK2 mit AHK3 war mit dem in Abbildung 14A dargestellten Ergebnis identisch und wurde aus diesem Grund nicht abgebildet. Für die Interaktionen AHK2-AHP5 (Abbildung 14C) und AHK2-ARR14 (Abbildung 14D) konnte gezeigt werden, dass die C-terminale *Receiver*-Domäne von AHK2 mit AHP5 und mit ARR14 interagiert.

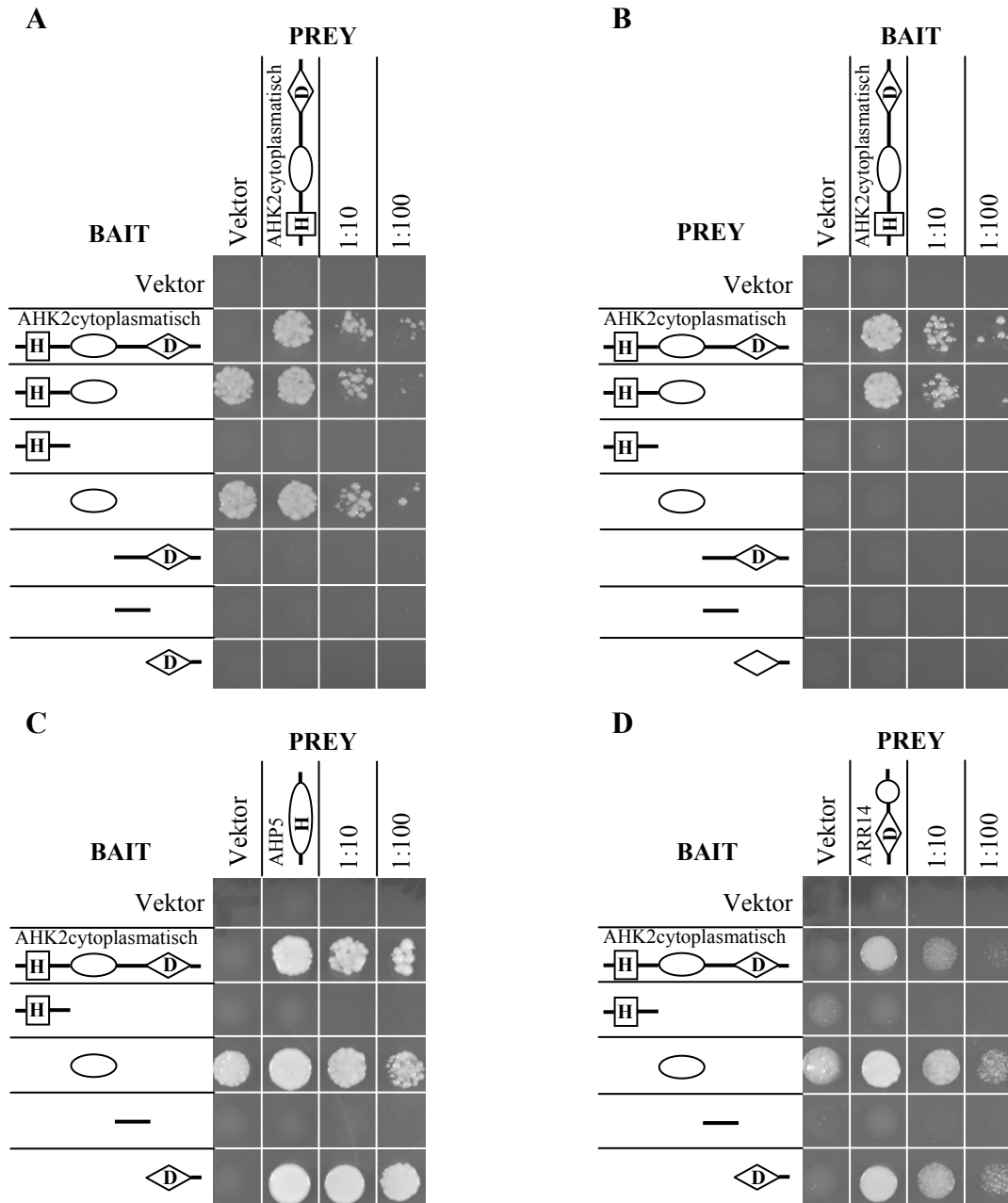


Abbildung 14. Die interagierenden Domänen des Rezeptors AHK2. Die cytoplasmatische Domäne von AHK2 wurde in sechs Domänen unterteilt und diese jeweils (A) als *Bait* und (B) *Prey*-Fusionsproteine auf Selbstinteraktion und jeweils vier Domänen als *Bait* auf Interaktion mit (C) AHP5 und (D) ARR14 im *Yeast Two-Hybrid* System untersucht. Jeweils 10 μ L der entsprechenden Kulturen (OD_{600} 0,2) sowie 1:10 und 1:100 verdünnte Kulturen wurden auf Interaktionsmedium (-His -Ura) aufgetragen.

3.3.2 Interaktionskartierung des Histidinphosphotransmitters AHP5

Der Histidinphosphotransmitter AHP5 wurde in zwei Domänen unterteilt (Abbildung 13) und auf Interaktionen mit AHK3, AHK4, ARR2 und ARR4 untersucht (Abbildung 15). Es konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich des AHP5-Proteins zur Autoaktivierung führt und dieses mittels 5 mM 3-AT unterdrückt werden kann. Darüber hinaus wird für die Interaktionen mit den Partnerproteinen AHK2, AHK3, ARR2 und ARR4 das vollständige AHP5-Protein benötigt. Die Unterteilung des Proteins in zwei Domänen führt zum Interaktionsverlust.

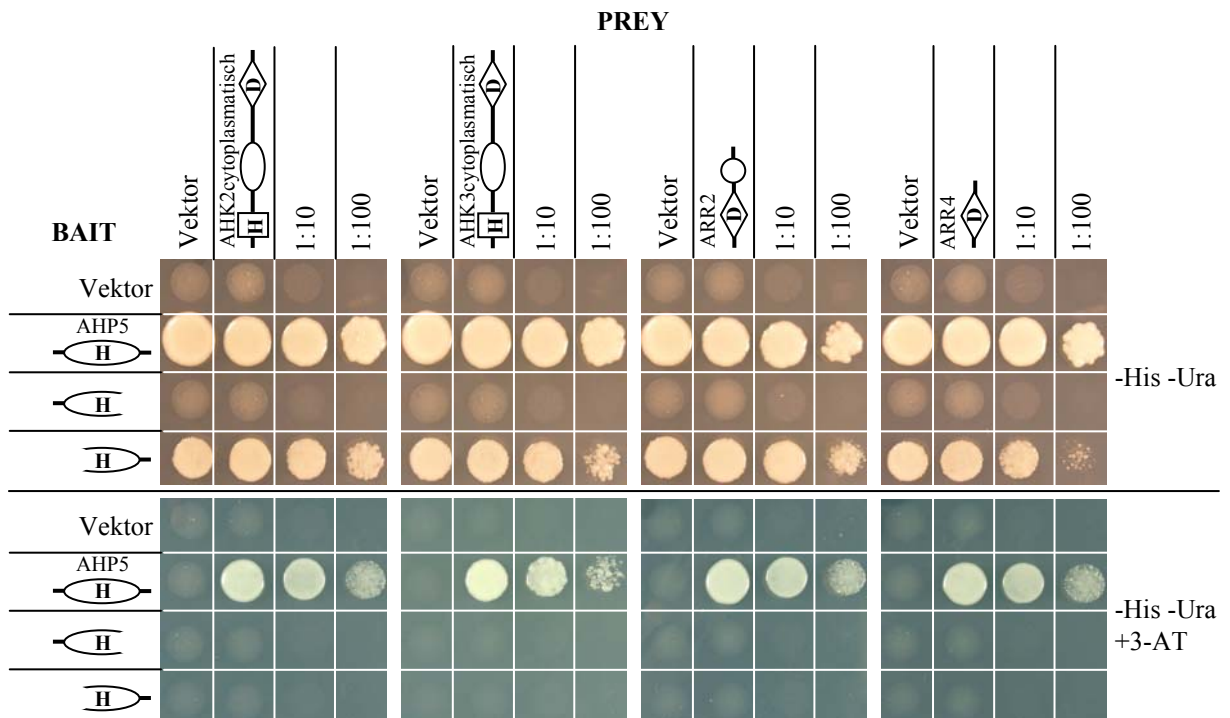


Abbildung 15. Interaktionsdomänen des Phosphotransmitters AHP5. AHP5 wurde in zwei Domänen unterteilt und diese jeweils als *Bait* auf Interaktionen mit der cytoplasmatischen Domäne von AHK2 und AHK3, mit ARR2 und ARR4 im *Yeast Two-Hybrid* System untersucht. Jeweils 10 μ L der entsprechenden Kulturen (OD_{600} 0,2) sowie 1:10 und 1:100 verdünnte Kulturen wurden auf Interaktionsmedium (-His -Ura) und auf 5 mM 3-AT-haltigem Interaktionsmedium (-His -Ura +3-AT) aufgetragen.

3.3.3 Interaktionskartierung des Typ-B Responseregulators ARR14

ARR14 wurde in zwei Domänen unterteilt (Abbildung 13). Die Kartierung der Interaktionsdomänen erfolgte durch Untersuchung der Interaktionen mit AHK2 und AHP5, der Selbstinteraktion und der Interaktion mit ARR2. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt, aus der hervorgeht, dass in *Bait*-Orientierung (Abbildung 16A) die Autoaktivierung des ARR14-Proteins durch die C-terminale Verlängerung hervorgerufen wird und diese mittels 3-AT unterdrückt werden kann. In *Prey*-Orientierung (Abbildung 16B) ist diese Autoaktivierung nicht zu beobachten. Für die Interaktionen von ARR14 mit AHK2 und AHP5 führte die

Unterteilung des ARR14-Proteins zum Interaktionsverlust (Abbildung 16A). Für diese beiden Interaktionen wird somit das gesamte ARR14-Protein benötigt (Abbildung 16A). Sowohl für die Selbstinteraktion (Abbildung 16A) als auch für die Interaktion mit ARR2 (Abbildung 16B) konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Verlängerung für diese Interaktionen benötigt wird.

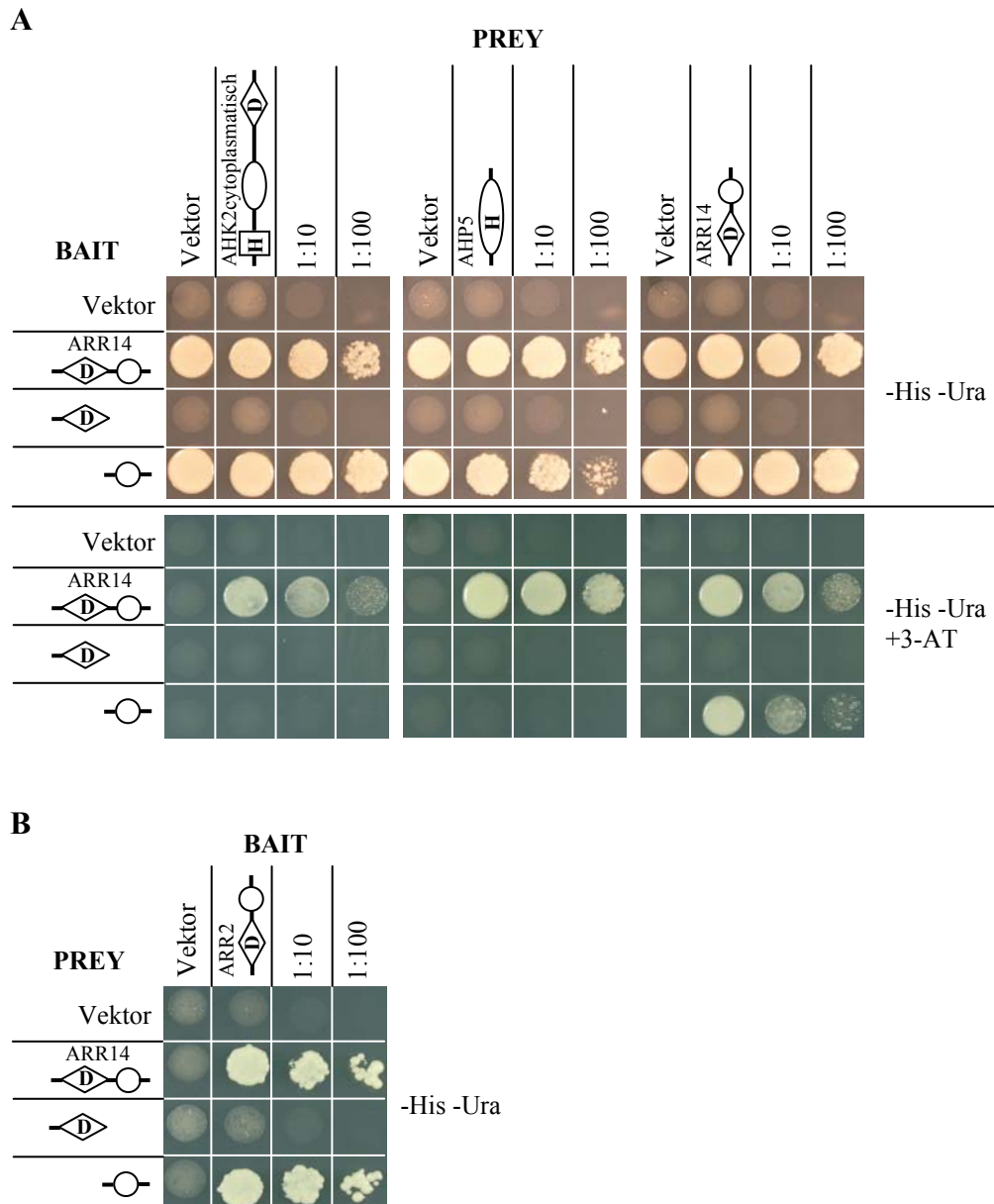


Abbildung 16. Die interagierenden Domänen des Responseregulators ARR14. ARR14 wurde in zwei Domänen unterteilt und jeweils **(A)** als *Bait*-Fusionsprotein auf Interaktionen mit AHK2, AHP5 und auf Selbstinteraktion und **(B)** als *Prey*-Fusionsprotein auf Interaktion mit ARR2 im *Yeast Two-Hybrid* System untersucht. Jeweils 10 µL der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Interaktionsmedium (-His -Ura) bzw. auf 5 mM 3-AT haltigem Interaktionsmedium (-His -Ura +3-AT) aufgetragen. Darüber hinaus wurden die Kulturen 1:10 und 1:100 verdünnt und ebenfalls auf dieselben Interaktionsmedien aufgetragen.

3.3.4 Interaktionskartierung des Typ-A Responseregulators ARR4

ARR4 wurde in zwei Domänen unterteilt (Abbildung 13) und auf Interaktion mit AHP5 untersucht (Abbildung 17). Die Unterteilung des ARR4-Proteins führt zum Interaktionsverlust, da für die Interaktion mit AHP5 das gesamte ARR4-Protein benötigt wird.

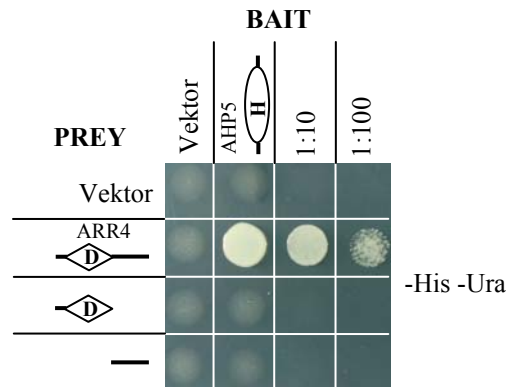


Abbildung 17. Interaktionsdomänen des Responseregulators ARR4. ARR4 wurde in zwei Domänen unterteilt und jeweils als *Prey*-Fusionsprotein auf Interaktion mit AHP5 im *Yeast Two-Hybrid* System untersucht. Jeweils 10 μ L der entsprechenden Kulturen (OD_{600} 0,2) wurden auf Interaktionsmedium (-His -Ura) aufgetragen. Darüber hinaus wurden die Kulturen 1:10 und 1:100 verdünnt und ebenfalls auf dieselben Interaktionsmedien aufgetragen.

3.4 Ergebnisse der *Library-Screens*

Mittels des Matrix-Ansatzes (Kapitel 3.2) konnte ein Beitrag zum Verständnis des ZKS geleistet werden, indem die ZKS-Proteine im Rastermuster auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht wurden. Die Regulation der Cytokininsignaltransduktion könnte aber nicht nur durch Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des ZKS erfolgen, sondern auch durch Interaktionen der ZKS-Proteine mit anderen Proteinen. Dieses wurde als nächstes Ziel angesetzt und sollte mittels der *Library-Screens* realisiert werden. Hierzu wurden die ZKS-Proteine als *Bait* auf Interaktionen mit dem *A. thaliana*-Proteom, das im Idealfall durch eine *Prey*-cDNA-Bank vollständig repräsentiert wird, untersucht.

In Abbildung 18 ist der Prozessverlauf eines *Library-Screens* dargestellt, der nachfolgend in seinen einzelnen Schritten erläutert werden soll: Nach der Transformation der *Prey*-cDNA-Bank wird die Anzahl der auf dem Interaktionsmedium gewachsenen Kolonien (Primärpositive) festgehalten. Bei mehr als 200 Primärpositiven wird der Wert > 200 notiert. Es werden maximal 96 Primärpositive zufällig ausgewählt und erneut auf frisches Interaktionsmedium ausgestrichen. Dieser Prozess wird als *Restreaking* bezeichnet und soll sicherstellen, dass die primärpositiven Klone nicht saprophytisch wachsen. Die auf dem frischen Interaktionsmedium gewachsenen Klone werden als Sekundärpositive bezeichnet, von denen maximal 48 weiterverarbeitet werden. Für die Weiterverarbeitung wird das unbekannte

Prey-Plasmid aus den Sekundärpositiven isoliert und zur Plasmidvermehrung in *E. coli* transformiert. Nach der Isolation des *Prey*-Plasmids aus jeweils zwei unterschiedlichen *E. coli* Klonen erfolgt eine Restriktionsanalyse zur Überprüfung auf das Vorhandensein eines cDNA-Fragmentes im unbekanntem *Prey*-Plasmid. Plasmide, die ein cDNA-Fragment enthalten, werden erneut mit demselben *Bait*-Plasmid in die Hefe retransformiert, um die Interaktion ein zweites Mal zu bestätigen. Dabei wird nach der Restriktionsanalyse für gleich große cDNA-Fragmente nur eines der beiden aus *E. coli* isolierten *Prey*-Plasmide retransformiert. Zeigt die Restriktionsanalyse hingegen zwei unterschiedlich große cDNA-Fragmente, dann werden beide Plasmide retransformiert. Hefe-Klone, in denen sich die Interaktion bestätigen lässt, werden als Retrafopositive bezeichnet.

Das unbekannte *Prey*-Plasmid der retrafopositiven Klone wird ansequenziert und anschließend das Insert identifiziert, indem die Nukleotidsequenz gegen die *Arabidopsis* Proteindatenbank (<http://www.arabidopsis.org/BLAST/>) durchmustert wird. Dabei werden die Einstellungen BLASTX (Nukleotidsequenz gegen Aminosäuresequenz) und AGI Protein-Datenbank vorgenommen.

Auf diese Weise wurden die ZKS-Proteine gegen bis zu sechs verschiedene *Prey*-cDNA-Banken (Kapitel 2.5.19), die aus verschiedenen Geweben aus *A. thaliana* hergestellt wurden, auf Interaktionen durchmustert. Die Ergebnisse hierzu werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

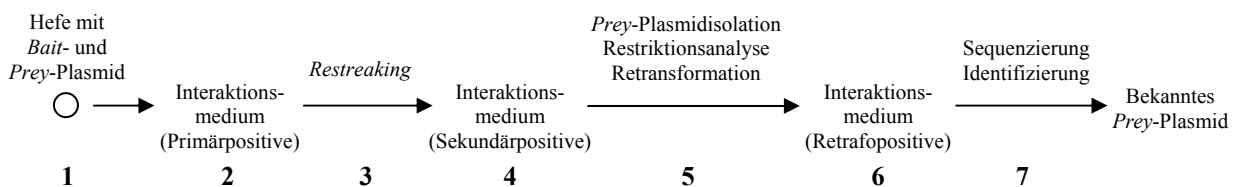


Abbildung 18. Prozessverlauf des Library-Screens. (1) Transformation der *Prey*-cDNA-Bank. (2) Primärpositive auf Interaktionsmedium werden (3) auf frisches Interaktionsmedium ausgestrichen (*restreaking*) und somit (4) auf die Sekundärpositiven selektiert. (5) Isolierung, Restriktionsanalyse und Retransformation des unbekanntem *Prey*-Plasmids aus den Sekundärpositiven. (6) Das unbekannte *Prey*-Plasmid der Retrafopositiven Klone wird identifiziert (7), indem es ansequenziert und das Insert im *Prey*-Plasmid gegen die Proteindatenbank durchmustert wird.

3.4.1 Library-Screens im *Prey*-Vektor pGAD10-GW

Die *Library-Screens* wurden anfangs im *Prey*-Vektor pGAD10-GW vorgenommen (Bürkle *et al.*, 2005). Hierzu wurden die zu dem Zeitpunkt vorhandenen vier cDNA-Banken *Blüten*, *Hormon*, *Keimlinge* und *Samen* (Kapitel 2.5.19) per LR-Rekombination (Kapitel 2.5.21) in den *Prey*-Vektor verschoben und mit 15 ZKS-Proteinen auf Interaktionen durchmustert. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der ersten *Library-Screens* zusammengefasst. Aus 38 *Screens* konnten

- Ergebnisse -

insgesamt 10 Retrafopositive für die *Baits* ARR1 (7), ARR2 (1) und ARR9 (1) aus der *Hormon*-cDNA-Bank und für ARR3 (1) aus der *Mixed*-cDNA-Bank identifiziert werden (Tabelle 21). Die *Mixed*-cDNA-Bank setzte sich aus den vier cDNA-Banken *Blüten*, *Hormon*, *Keimlinge* und *Samen* zusammen, die vor der Transformation im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt wurden.

Tabelle 21. Library-Screens mit dem Prey-Vektor pGAD10-GW.

<i>Bait</i>	cDNA-Bank	Anzahl der Transformanden	Primärpositive	Sekundärpositive	Retrafopositive
AHK1	Blüten	356.000	> 200	96 -> 4	0
	Hormon	322.000	> 200	96 -> 4	0
	Keimlinge	234.000	> 200	96 -> 4	0
	Samen	548.000	> 200	96 -> 4	0
	Mixed	200.000	> 200	96 -> 4	0
AHK2	Hormon	50.000	0	0	0
	Samen	202.000	1	1 -> 0	0
	Mixed	734.000	4	4 -> 0	0
AHK4	Blüten	26.120	0	0	0
	Hormon	2.000	0	0	0
	Samen	62.000	0	0	0
	Mixed	214.000	7	7 -> 0	0
AHP5	Hormon	784.000	0	0	0
	Mixed	450.000	1	1 -> 0	0
ARR3	Blüten	10.000	0	0	0
	Hormon	268.000	0	0	0
	Mixed	1.470.000	17	17 -> 0	0
	Mixed	1.580.000	4	4 -> 1	1
ARR4	Hormon	1.300.000	1	1 -> 0	0
	Mixed	46.000	3	3 -> 0	0
ARR5	Hormon	2.080.000	5	5 -> 0	0
	Mixed	560.000	2	2 -> 0	0
ARR6	Hormon	842.000	2	2 -> 0	0
	Mixed	644.000	6	6 -> 0	0
ARR7	Hormon	4.552.000	0	0	0
	Mixed	570.000	0	0	0
ARR8	Hormon	2.000.000	1	1 -> 0	0
	Hormon	2.045.000	0	0	0
ARR9	Hormon	807.000	24	24 -> 4	1
	Mixed	806.000	4	4 -> 0	0
ARR15	Hormon	1.300.000	1	1 -> 0	0
	Hormon	2.000.000	9	9 -> 0	0
ARR16	Mixed	204.000	2	2 -> 0	0
	Hormon	2.000.000	3	3 -> 1	0
ARR1	Hormon	1.052.000	47	47 -> 37	7
	Mixed	1.032.000	0	0	0
ARR2	Hormon	278.000	2	2 -> 2	1
	Mixed	310.000	0	0	0

Erläuterungen zur Tabelle: Die *Mixed*-cDNA-Bank setzt sich aus den cDNA-Banken *Blüten*, *Hormon*, *Samen* und *Keimlinge* im Verhältnis 1:1:1:1 zusammen, weitere Einzelheiten zu diesen cDNA-Banken sind dem Kapitel 2.5.19 zu entnehmen; Bei mehr als 200 Primärpositiven wurde der Wert > 200 notiert; Die Zahl vor dem Pfeil in der Spalte Sekundärpositive gibt die Anzahl der Primärpositiven an (maximal 96), die auf frisches Interaktionsmedium überführt (*Restreaking*) wurden. Die Zahl hinter dem Pfeil gibt die Anzahl der Sekundärpositiven Klone an, Klone die nach dem *Restreaking* angewachsen sind.

Die Inserts der unbekanntenen *Prey*-Plasmide aus den Retrafopositiven Klonen wurden ansequenziert und identifiziert. In Tabelle 22 sind die *Baits* mit ihren identifizierten Interaktionspartnern aufgelistet. Aus der *Hormon*-cDNA-Bank konnten verschiedene AHPs als Interaktionspartner identifiziert werden, beispielsweise AHP1 (AT3G21510) und AHP3 (AT5G39340) für ARR1 und AHP3 (AT5G39340) für ARR2. Diese Interaktionen sind bekannt und konnten in diesem System bestätigt werden. Darüber hinaus konnte für ARR1 die

Interaktion mit dem Vip1-Protein (AT1G43700) identifiziert werden, das nur in Pflanzen vorkommt und mit dem Virulenzfaktor VirE2 aus *Agrobacterium tumefaciens* interagiert. Es wird vermutet, dass Vip1 für den Kerntransport von VirE2 (bindet an die T-DNA) benötigt wird (Li *et al.*, 2005). Für ARR3 konnte eine Interaktion mit einem DnaJ-ähnlichem Protein (AT5G09540) aus der *Mixed*-cDNA-Bank identifiziert werden. Die Funktion von AT4G21105, dem Interaktionspartner von ARR9 aus der *Hormon*-cDNA-Bank, ist unbekannt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die verwendeten cDNA-Banken von guter Qualität sind, da sowohl bekannte Interaktionen bestätigt als auch unbekannt Interaktionen identifiziert wurden.

Tabelle 22. Protein-Protein-Interaktionen mit dem Prey-Vektor pGAD10-GW.

Bait	cDNA-Bank	Anzahl der Interaktionen	Interagierender Prey (Lokus)	Funktion bzw. homologes Gen (Funktionelle Klassifizierung)
ARR1	Hormon	4x	AHP1 (AT3G21510)	Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		2x	AHP3 (AT5G39340)	Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		1x	Vip1 (AT1G43700)	VirE2 interagierendes Protein (Transport)
ARR2	Hormon	1x	AHP3 (AT5G39340)	Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
ARR3	Mixed	1x	unbekannt (AT5G09540)	DNAJ-ähnliches Protein (Proteinschicksal)
ARR9	Hormon	1x	COXX4 (AT4G21105)	COXX4: Cytochrom c oxidase Untereinheit X4 (Energieproduktion)

3.4.2 Library-Screens im Prey-Vektor pACT2/pACT2-GW

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die nachträglich bezogenen cDNA-Banken *Koncz* und *Theologis* (Kapitel 2.5.19) auf interagierende Proteine durchmustert (Tabelle 23). Diese cDNA-Banken wurden bereits in den *Yeast Two-Hybrid* kompatiblen Prey-Vektor pACT2 kloniert und mussten nicht verschoben werden. Die *Screens* wurden hauptsächlich mit der cDNA-Bank *Koncz* durchgeführt, da aus ihr die meisten Interaktionen identifiziert wurden. Es wurde vermutet, dass der Erfolg dieser *Screens* auf den pACT2-Vektor zurückzuführen ist, so dass die im Prey-Vektor pGAD10-GW bereits durchmusterten cDNA-Banken (Tabelle 21) erneut im Prey-Vektor pACT2-GW durchmustert wurden (Tabelle 23). Die *Baits* AHK3 und ARR10 wurden nachträglich kloniert. *Screens* mit diesen beiden Proteinen wurden auf 3-AT-haltigem Interaktionsmedium durchgeführt, obwohl keine Autoaktivierung vorlag. Ausschlaggebend für diese Vorgehensweis waren häufig auftretende Interaktionen, die durch autoaktivierende Prey-Proteine, Histone (Tabelle 24), hervorgerufen wurden. Mittels 5 mM 3-AT konnte die unerwünschte Autoaktivierung unterdrückt werden.

In Tabelle 23 sind die Ergebnisse des zweiten *Screen*-Ansatzes zusammengefasst. Aus 42 *Screens* konnten insgesamt 607 Retrafopositive ermittelt werden. Bis auf wenige Ausnahmen konnten für jedes *Bait* Retrafopositive identifiziert werden.

Ein Vergleich der beiden *Screens* (Tabelle 23 und Tabelle 21) lässt erkennen, dass die erzielten Transformationsraten schwanken. Folgende Beobachtungen führten zur Erhöhung der

- Ergebnisse -

Transformationsrate: Die Transformationsrate nahm zu, wenn der Hefe-Stamm vor dem *Screen* frisch auf Selektivmedium ausgestrichen und für 2-3 Tage inkubiert wurde. Darüber hinaus ist dem Hefe-Transformationsprotokoll (Kapitel 2.5.5) zu entnehmen, dass Transformationen bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 durchgeführt werden sollen. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass Transformationen bei höheren OD-Werten (0,9 bis 1) höhere Transformationsraten liefern. Aus diesem Grund wurden die Transformationen für die meisten *Baits*, die in Tabelle 23 aufgeführt sind, bei einer OD₆₀₀ von mindestens 0,9 durchgeführt.

Tabelle 23. Library-Screens mit dem Prey-Vektor pACT2/pACT2-GW.

Bait	cDNA-Bank	Anzahl der Transformanden	Primärpositive	Sekundärpositive	Retrafopositive
AHK1	Koncz	492.750	2	2 -> 2	1
AHK2	Koncz	550.000	57	57 -> 46	7
AHK2	Koncz	3.720.050	> 200	96 -> 90	11
AHK2	Koncz	3.964.000	> 200	96 -> 84	12
AHK2	Koncz	4.230.000	> 200	96 -> 91	12
AHK2	Blüten	536.800	> 200	96 -> 21	9
AHK2	Hormon	158.240	> 200	96 -> 14	3
AHK2	Samen	827.200	> 200	96 -> 23	9
AHK2	Keimlinge	1.092.200	> 200	96 -> 6	1
AHK2	Theologis	46.000	13	13 -> 13	12
AHK3	Koncz	1.164.440	5 (3-AT)	5 -> 3	3
AHK3	Hormon	131.560	0 (3-AT)	0	0
AHK3	Samen	3.660.800	2 (3-AT)	2 -> 0	0
AHK3	Keimlinge	1.969.400	0 (3-AT)	0	0
AHK4	Koncz	1.123.300	36	36 -> 31	10
AHK4	Koncz	2.111.300	28	28 -> 27	6
AHK4	Koncz	2.952.000	41	41 -> 35	6
AHK4	Koncz	1.903.500	68	68 -> 66	26
AHK4	Samen	55.255	54	54 -> 43	33
AHK4	Keimlinge	41.140	55	55 -> 37	23
AHK4	Theologis	234.600	2	2 -> 2	2
AHP5	Koncz	145.820	12	12 -> 10	4
ARR3	Koncz	909.000	181	96 -> 77	48
ARR4	Koncz	177.120	86	86 -> 82	13
ARR5	Koncz	373.500	> 200	96 -> 64	47
ARR6	Koncz	289.800	95	95 -> 92	22
ARR7	Koncz	799.000	125	96 -> 67	44
ARR7	Blüten	1.740.000	> 200	96 -> 18	3
ARR7	Blüten	1.505.000	> 200	96 -> 24	4
ARR7	Hormon	1.230.000	> 200	96 -> 30	13
ARR7	Samen	1.610.000	> 200	96 -> 24	6
ARR7	Samen	5.460.000	> 200	96 -> 22	4
ARR8	Koncz	864.300	> 200	96 -> 29	16
ARR9	Koncz	220.590	> 200	96 -> 60	34
ARR15	Koncz	929.200	> 200	96 -> 75	16
ARR15	Blüten	703.000	> 200	96 -> 64	24
ARR15	Hormon	265.000	> 200	96 -> 24	5
ARR15	Keimlinge	332.000	> 200	96 -> 33	17
ARR16	Koncz	1.769.450	> 200	96 -> 61	34
ARR1	Koncz	708.750	81	81 -> 71	28
ARR2	Koncz	797.650	150	96 -> 74	39
ARR10	Koncz	1.090.100	> 200 (3-AT)	96 -> 0	0

Erläuterungen zur Tabelle: Einzelheiten zu den cDNA-Banken sind dem Kapitel 2.5.19 zu entnehmen; Bei mehr als 200 Primärpositiven wurde der Wert > 200 notiert; Die Zahl vor dem Pfeil in der Spalte Sekundärpositive gibt die Anzahl der Primärpositiven an (maximal 96), die auf frisches Interaktionsmedium überführt (*Restreaking*) wurden. Die Zahl hinter dem Pfeil gibt die Anzahl der Sekundärpositiven Klone an, Klone die nach dem *Restreaking* angewachsen sind. Abkürzungen: 3-AT, 3-amino-1,2,4-triazol.

Von den unbekanntem *Prey*-Plasmiden der 607 retrafopositiven Klone wurden insgesamt 515 ansequenziert und anschließend identifiziert. In Tabelle 24 sind die 17 *Baits* mit ihren identifizierten Interaktionspartnern aufgelistet. Insgesamt wurden 178 verschiedene

- Ergebnisse -

Interaktionen identifiziert, darunter die 14 bekannten Interaktionen AHK4-AHP2, AHP5-ARR1, ARR3-AHP1/2, ARR8-AHP1/3, ARR9-AHP2/3, ARR1-AHP1/2/3 und ARR2-AHP1/2/3 (Kapitel 1.2) und die Interaktionen AHK2-AHP2/3, AHP5-ARR4, ARR3-AHP3, ARR5-AHP2/3 und ARR7-AHP1/2/3, die bereits im Matrix-Ansatz (Kapitel 3.2.4) als neue Interaktionen identifiziert werden konnten.

Tabelle 24. Protein-Protein-Interaktionen mit dem *Prey*-Vektor pACT2/pACT2-GW.

Bait	cDNA-Bank	Anzahl	Interagierender <i>Prey</i> (Lokus)	Homologes Gen oder homologe Domäne (Funktionelle Klassifizierung)	
AHK1	Koncz	1x	LSH1 (AT5G28490)	LSH1: - <i>Light dependent short hypocotyl 1</i> (Signaltransduktion)	
AHK2	Koncz	5x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)	
		1x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)	
		4x	PI3-/4-K (AT1G26270)	PI3,4K: - Phosphatidylinositolkinase (Signaltransduktion)	
		1x	PI4Kβ1 (AT5G64070)	PI4K: - Phosphatidylinositolkinase (Signaltransduktion)	
		4x	ADL1 (AT5G42080)	ADL1: - Dynamin-ähnliches Protein (Biogenese)	
		3x	ANAC081 (AT5g08790)	ANAC081: - Protein mit NAM-Domäne (Transkription)	
		1x	ANAC089 (AT5G53950)	ANAC089: - Protein mit NAM-Domäne (Transkription)	
		1x	ANAC102 (AT5G63790)	ANAC102: - Protein mit NAM-Domäne (Transkription)	
		3x	Unbekannt (AT4G12060)	CLP: - Protein mit Clp-Domäne (Proteinschicksal)	
		1x	Unbekannt (AT3G09130)	UN1: - Unbekannt	
		2x	Unbekannt (AT3G18280)	LIPT1: - Lipidtransferähnliches-Protein (Metabolismus)	
		1x	VRN1 (AT3G18990)	VRN1: - Vernalisierung-Antwortprotein (Transkription)	
		1x	Unbekannt (AT1G31810)	FH2: - Protein mit FH2-Domäne (Zellorganisation)	
		1x	Unbekannt (AT1G65430)	UN2: - Zinkfinger-ähnliches Protein (Klassifizierung nicht möglich)	
		1x	Unbekannt (AT1G77370)	GTR: - Glutaredoxin-ähnliches Protein (Transport)	
		1x	Unbekannt (AT5G11490)	AD: - Adaptin-ähnliches Protein (Transport)	
		1x	Unbekannt (AT3G59910)	UN3: - Unbekannt	
		1x	Unbekannt (AT4G39820)	UN4: - Unbekannt	
		1x	SUI (AT4G27130)	SUI: - Proteintranslationsfaktor (Proteinsynthese)	
		1x	Band 7 (AT5g62740)	BAND7: - Protein der Band 7 Familie (Transport)	
		2x	RPN1A (AT2G20580)	RPN1A: - 26S-Proteasom Untereinheit (Proteinschicksal)	
		1x	Unbekannt (AT3G52920)	UN5: - Unbekannt	
		1x	Unbekannt (AT3G11100)	UN6: - Unbekannt	
		1x	AOS (AT5G42650)	AOS: - Allenoxidsynthase (Metabolismus)	
		1x	Unbekannt (AT5G42060)	UN7: - Unbekannt	
		Blüten	1x	Unbekannt (AT1G69840)	UN8: - Unbekannt
			1x	Unbekannt (AT3G48600)	SWIB: - Protein mit SWIB-Domäne (Chromatin/Chromosomenstruktur)
			1x	Unbekannt (AT1G64330)	USO1: - USO1-ähnliches Protein (Transport)
			1x	RPL12 (AT3G27830)	RPL12: - 50S-Ribosomales Protein (Proteinsynthese)
			1x	Unbekannt (AT3G59910)	UN3: - Unbekannt
			1x	Unbekannt (AT2G15300)	UN9: - Rezeptorähnliche Proteinkinase (Klassifizierung nicht möglich)
			1x	Unbekannt (AT1G31810)	FH2: - Protein mit FH2-Domäne (Zellorganisation)
			1x	Unbekannt (AT5G52410)	UN10: - Unbekannt
	1x		RPL9 (AT1G33140)	RPL9: - 60S-Ribosomales Protein (Proteinsynthese)	
	Hormon		1x	Unbekannt (AT2G33430)	UN11: - Unbekannt
		1x	Unbekannt (AT5G48470)	UN12: - Unbekannt	
		1x	Unbekannt (AT1G17100)	UN13: - SOUL-ähnliches Protein (Klassifizierung nicht möglich)	
	Samen	1x	Unbekannt (AT5G07010)	UN14: - Sulfotransferase-ähnliches Protein (Klassifizierung nicht möglich)	
		1x	Unbekannt (AT4G27160)	LIPT2: - Lipidtransfer-ähnliches Protein (Metabolismus)	
		1x	AGP15 (AT5G11740)	AGP15: - Arabinogalactan Protein (Signaltransduktion)	
		1x	RBCS-1A (AT1G67090)	RBCS1A: - RUBISCO-Untereinheit 1A (Metabolismus)	
		1x	Band 7 (AT5G62740)	BAND7: - Protein der Band 7 Familie (Transport)	
		1x	COX 6B (AT1G22450)	COX6B: - Cytochrom c oxidase Untereinheit 6B (Energieproduktion)	
		1x	Unbekannt (AT1G53900)	eIF: - eIF-2B-ähnliches Protein (Proteinsynthese)	
		1x	CYP20 (AT5G13120)	CYP: - Cyclophilin-ähnliches Protein (Proteinschicksal)	
		1x	RPT2A (AT4G29040)	RPT2A: - 26S-Proteasom AAA-ATPase Untereinheit (Proteinschicksal)	
	Keimlinge	1x	ADL1 (AT5G42080)	ADL1: - Dynamin-ähnliches Protein (Biogenese)	
Theologis	7x	Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)		
	1x	RPL12 (AT3G27830)	RPL12: - 50S-Ribosomales Protein (Proteinsynthese)		
	1x	Histon H3 (AT5G65360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)		
	1x	Unbekannt (AT3G10020)	UN15: - Unbekannt		
AHK3	Koncz	3x	Unbekannt (AT5G43560)	MATH: - Protein mit MATH-Domäne (Metabolismus)	

- Ergebnisse -

Tabelle 24. (Fortsetzung).

Bait	cDNA-Bank	Anzahl	Interagierender Prey (Lokus)	Homologes Gen oder homologe Domäne (Funktionelle Klassifizierung)
AHK4	Koncz	4x	Unkannt (AT5G16070)	CHAP1: - Chaperonin-ähnliches Protein (Proteinschicksal)
		5x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		14x	GAPDH (AT1G79530)	GAPDH1: - Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Metabolismus)
		3x	GAPDH (AT1G13440)	GAPDH2: - Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Metabolismus)
		1x	Unbekannt (AT2G47950)	UN16: - Unbekannt
		3x	Unbekannt (AT1G31780)	UN17: - Unbekannt
		3x	LSH1 (AT5G28490)	LSH1: - <i>Light dependent short hypocotyl 1</i> (Signaltransduktion)
		1x	GNOM (AT1G13980)	GNOM: - Strukturprotein (Zellorganisation)
		2x	AMP-D (AT2G38280)	AMP-D: - AMP-Deaminase-ähnliches Protein (Metabolismus)
		1x	Unbekannt (AT1G08430)	UN18: - Protein mit UPF0005-Domäne (Klassifizierung nicht möglich)
		2x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Unbekannt (AT5G10940)	WD: - Protein mit WD-40-Domänen (Signaltransduktion)
		1x	Unbekannt (AT2G45820)	UN19: - DNA-bindendes Protein (Klassifizierung nicht möglich)
		1x	Unbekannt (AT5G58090)	GLYL: - Glycosylhydrolase-ähnliches Protein (Metabolismus)
		AHK4	Samen	2x
2x	Unbekannt (AT4G15630)			UN20: - Unbekannt
3x	Unbekannt (AT5G60570)			FBOX1: - Protein mit F-box-Domäne (Proteinschicksal)
2x	S15A (AT5G59850)			S15A: - 40S-Ribosomales Protein (Proteinsynthese)
2x	Unbekannt (AT1G25260)			60SA: - 60S-Ribosomales Protein-ähnliches Protein (Proteinsynthese)
2x	Unbekannt (AT5G59613)			UN21: - Unbekannt
4x	Histon H3 (AT5G10980)			DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
1x	Unbekannt (AT2G18730)			DAG: - Diacylglycerolkinase-ähnliches Protein (Signaltransduktion)
2x	Unbekannt (AT1G51650)			ATPe: - Protein mit ATP synthase epsilon-Domäne (Energieproduktion)
1x	PIP1B (AT2G45960)			PIP1B: - Aquaporin (Transport)
1x	Unbekannt (AT1G62070)		UN22: - Unbekannt	
Keimlinge	2x		RPS8A (AT5G20290)	RPS8A: - 40S-Ribosomales Protein (Proteinsynthese)
	1x		Unbekannt (AT3G11070)	UN23: - OMP85-ähnliches Protein (Klassifizierung nicht möglich)
	3x		Histon H4 (AT5G59970)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
	9x		Histon H3 (AT5G65360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
	3x		Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
	2x		LHCB2 (AT2G05070)	LHCB2: - Chlorophyll A-B-bindendes Protein (Energieproduktion)
	1x		WNK5 (AT3G51630)	WNK5: - Proteinkinase (Proteinschicksal)
Theologis	2x		Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
AHP5	Koncz		2x	ARR4 (AT1G10470)
		1x	ARR1 (AT3G16857)	ARR1: - Typ-B Responseregulator (Signaltransduktion)
		1x	ARR3 (AT5G39340)	ARR3: - Typ-B Responseregulator (Signaltransduktion)
ARR3	Koncz	16x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		7x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		5x	AHP1 (AT3G21510)	AHP1: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		1x	Unbekannt (AT5G48990)	FBOX2: - Protein mit F-box Domäne (Proteinschicksal)
		2x	Unbekannt (AT5G53880)	UN24: - Unbekannt
		1x	Unbekannt (AT1G29990)	PREF: - Prefoldin-ähnliches Protein (Proteinschicksal)
		2x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Unbekannt (AT3G27360)	UN25: - Unbekannt
ARR4	Koncz	7x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H3 (AT3G27360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H4 (AT5G59970)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H3 (AT5G10400)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H4 (AT3G45930)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	WIP2 (AT3G57670)	WIP2: - C2H2-Typ Zinkfinger Protein (Transkription)
		1x	Unbekannt (AT3G12620)	SET: - Protein mit Ser/Thr Phosphatase-Domäne (Signaltransduktion)
ARR5	Koncz	13x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		7x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		1x	RPL32B (AT5G46430)	RPL32B: - 60S-Ribosomales Protein L32 (Proteinsynthese)
		1x	ARAC8 (AT3G48040)	ARAC8: - GTPase (Signaltransduktion)
		1x	KIS (AT2G30410)	KIS: - Tubulin-folding Cofaktor A - (Proteinschicksal)
		1x	PBP1 (AT5G54490)	PBP1: - PINOID-bindendes Protein (Signaltransduktion)
		2x	Unbekannt (AT1G68790)	UN25: - Unbekannt
		1x	THRRS (AT5G26830)	THRRS: - Threonyl-tRNA-Synthetase (Proteinsynthese)
		1x	Unbekannt (AT5G46250)	UN26: - Protein mit RNA-Bindemotif (Klassifizierung nicht möglich)
		1x	Unbekannt (AT5G08720)	UN27: - Unbekannt
		1x	Unbekannt (AT1G13030)	UN28: - Unbekannt
		2x	ATC4H (AT2G30490)	ATC4H: - Cinnamat-4-Hydroxylase (Metabolismus)
		1x	RPS3A (AT4G34670)	RPS3A: - 40S-Ribosomales Protein (Proteinsynthese)
		1x	Unbekannt (AT5G62440)	UN29: - Unbekannt
		2x	Unbekannt (AT1G52070)	JAC: - Protein mit Jacalin-ähnlicher Lektin-Domäne (Stress, Defensive oder Detoxifizierung)
		1x	RPT2A (AT4G29040)	RPT2A: - 26S-Proteasom AAA-ATPase Untereinheit (Proteinschicksal)
		1x	Unbekannt (AT4G17240)	UN30: Unbekannt
1x	Unbekannt (AT5G19650)	UN31: - Ovat-ähnliches Protein (Klassifizierung nicht möglich)		
1x	AtJ3 (AT3G44110)	ATJ3: - DNAJ-Hitzeschock Protein (Proteinschicksal)		

- Ergebnisse -

Tabelle 24. (Fortsetzung).

Bait	cDNA-Bank	Anzahl	Interagierender Prey (Lokus)	Homologes Gen oder homologe Domäne (Funktionelle Klassifizierung)
ARR6	Koncz	10x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		2x	AZF3 (AT5G43170)	AZF3: - C2H2-Typ Zinkfinger Protein (Transkription)
		5x	Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Unbekannt (AT5G63460)	BROM1: - Protein mit Bromo-Domäne (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Unbekannt (AT5G65630)	BROM2: - Protein mit Bromo-Domäne (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H3 (AT4G40040)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	LSH1 (AT5G28490)	LSH1: - <i>Light dependent short hypocotyl 1</i> (Signaltransduktion)
ARR7	Koncz	18x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		12x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		1x	Unbekannt (AT1G68790)	UN25: - Unbekannt
		1x	Unbekannt (AT2G31160)	DUF: - Protein mit DUF640-Domäne (Stress, Defensive oder Detoxifizierung)
		1x	Unbekannt (AT5G48630)	CYC: - Cyclin-ähnliches Protein (Zellzyklus)
		1x	BIP (AT5G42020)	BIP: - Chaperon (Proteinschicksal)
		2x	Unbekannt (AT5G08720)	UN27: - Unbekannt
	Blüten	1x	Histon H3 (AT5G65360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	NAP (AT2G19480)	NAP: - Histonchaperon (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		2x	AZF3 (AT5G43170)	AZF3: - C2H2-Typ Zinkfinger Protein (Transkription)
		1x	Unbekannt (AT3G02060)	DEAD: - Protein mit DEAD-box Helikase-Domäne (Genomerhaltung)
	Hormon	6x	AHP1 (AT3G21510)	AHP1: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		5x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		2x	ATNUDT3 (AT1G79690)	ATNUD: - Isopentenyl-Diphosphat Delta-Isomerase (Metabolismus)
Samen	10x	Unbekannt (AT1G68790)	UN25: - Unbekannt	
ARR8	Koncz	13x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		1x	AHP1 (AT3G21510)	AHP1: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
ARR9	Koncz	9x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		3x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		3x	Histon H3 (AT3G27360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H3 (AT5G10400)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		4x	Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		5x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Unbekannt (AT1G16970)	KU70: - Ku70-ähnliches Protein (Genomerhaltung)
		1x	Histon H3 (AT5G65360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
ARR15	Koncz	10x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		3x	Histon H3 (AT4G40040)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		2x	Histon H4 (AT3G45930)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
	Blüten	6x	Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		2x	Histon H3 (AT5G65360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		2x	AZF3 (AT5G43170)	AZF3: - C2H2-Typ Zinkfinger Protein (Transkription)
		1x	Unbekannt (AT5G08720)	UN27: - Unbekannt
	1x	Unbekannt (AT3G02060)	DEAD: - Protein mit DEAD-box Helikase-Domäne (Genomerhaltung)	
	Hormon	5x	Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		Keimlinge	7x	Histon H4 (AT5G59970)
5x	Histon H3 (AT5G10980)		DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)	
2x	Unbekannt (AT5G08720)		UN27: - Unbekannt	
1x	CAB2 (AT1G29920)	CAB2: - Chlorophyll A-B-bindendes Protein (Energieproduktion)		
ARR16	Koncz	9x	Histon H3 (AT5G10980)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		9x	Histon H3 (AT4G40030)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		6x	Histon H3 (AT4G40040)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	Histon H3 (AT5G65360)	DNA-bindendes Protein (Chromatin/Chromosomenstruktur)
		1x	WIP2 (AT3G57670)	WIP2: - C2H2-Typ Zinkfinger Protein (Transkription)
		1x	Unbekannt (AT5G08720)	UN27: - Unbekannt
ARR1	Koncz	14x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		2x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		1x	AHP1 (AT3G21510)	AHP1: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		3x	ATERF8 (AT1G53170)	ATERF8: - Ethylenantwortprotein bindendes Protein (Signaltransduktion)
		2x	Unbekannt (AT4G26000)	UN32: - Protein mit KH-Domäne (Klassifizierung nicht möglich)
		1x	Unbekannt (AT3G28430)	UN33: - Unbekannt
		1x	UBQ1 (AT3G52590)	UBQ1: - Ubiquitinylierung (Proteinschicksal)
ARR2	Koncz	20x	AHP3 (AT5G39340)	AHP3: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		7x	AHP2 (AT3G29350)	AHP2: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		5x	AHP1 (AT3G21510)	AHP1: - Histidinphosphotransmitter (Signaltransduktion)
		2x	HMT-1 (AT3G25900)	HMT1: - Homocystein S-Methyltransferase 1 (Metabolismus)
		2x	GSTU11 (AT1G69930)	GSTU11: - Glutathion-S-Transferase (Stress, Abwehr oder Detoxifizierung)
		1x	GRF5 (AT5G16050)	GRF5: - 14-3-3 Protein GF14 upsilon (Aktivator, Repressor von Proteinen)

Erläuterungen zur Tabelle: Einzelheiten zu den cDNA-Banken sind dem Kapitel 2.5.19 zu entnehmen; In der Spalte Anzahl wird die Häufigkeit des identifizierten Preys aufgeführt. Farblich markierte Preys interagieren mit verschiedenen Baits und/oder wurden aus verschiedenen cDNA-Banken identifiziert. Unbekannte Preys, für die homologe Domänen identifiziert werden konnten, erhielten ein selbstausgewähltes Kürzel. Unbekannte Preys, für die keine Daten gefunden wurden, erhielten das Kürzel UN.

Bei den 515 ansequenzierten Proben stellte sich heraus, dass insgesamt 140 (27 %) für die autoaktivierenden Histon-Proteine kodieren. Die Autoaktivierung der Histon-Proteine konnte mittels 5 mM-3AT unterdrückt werden, so dass die *Screens* mit den *Baits* AHK3 und ARR10, obwohl diese keine Autoaktivierung zeigen, auf 3-AT-haltigem Interaktionsmedium durchgeführt wurden (Tabelle 23).

Bei dieser Vorgehensweise wird nicht nur die Autoaktivierung, sondern möglicherweise auch Interaktionen zwischen potentiell interagierenden Proteinen unterdrückt, so dass ein großer Anteil an echten Interaktionen unidentifiziert bleibt. Der Prozess der *Library-Screens* wurde diesbezüglich optimiert. Hierzu wurde eine alternative Methode, die Koloniehybridisierung (Kapitel 2.5.22), herangezogen. Diese Methode diene gleichzeitig der Vorselektion bekannter Interaktionen.

Für die Etablierung der Methode im Labor wurde eine radioaktiv markierte AHP2-cDNA-Sonde hergestellt und gegen verschiedene Plasmide hybridisiert, die aus den Retrafopositiven aus den *Library-Screens* auf einer Membran fixiert wurden. Es wurden Retrafopositive ausgewählt, die sowohl AHP2-enthaltende Plasmide (Positiv-Kontrollen) als auch AHP2-ähnliche, AHP1-, AHP3- und AHP5-enthaltende Plasmide (Negativ-Kontrollen), trugen. Die Koloniehybridisierung zeigte, dass die verwendete AHP2-cDNA-Sonde spezifisch an AHP2-enthaltende Plasmide hybridisiert (Abbildung 19). Das Hybridisierungssignal ist unterschiedlich stark und hängt von der Plasmidmenge ab, die nach Zellaufschluss auf die Membran fixiert wurde. Die Plasmidmenge hängt wiederum davon ab, wie stark die Retrafopositiven auf der Membran angewachsen sind. Je höher die Zelldichte, desto höher die Plasmidmenge. Beispielsweise zeigte B2 eine hohe Zelldichte auf der Membran und somit auch das stärkste Signal, E4 zeigte eine geringe Zelldichte und somit ein schwaches Signal. Für C5 konnte kein Signal detektiert werden, obwohl dieser Klon ein AHP2-enthaltendes Plasmid trug. Dies ist darauf zurückzuführen, dass dieser Hefe-Klon auf der Membran kaum angewachsen war und somit für die Hybridisierung eine kaum detektierbare Menge an Plasmid zur Verfügung stand.

Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass die Koloniehybridisierung, unter der Voraussetzung, dass auf der Membran eine ausreichend hohe Zelldichte und somit eine hohe Menge an Plasmid vorliegt, eine gute Methode zur Vorselektion von Klonen darstellt, die ein bekanntes Plasmid tragen. Auf diese Weise lässt sich der Arbeitsaufwand der *Screens* erheblich reduzieren.

- Ergebnisse -

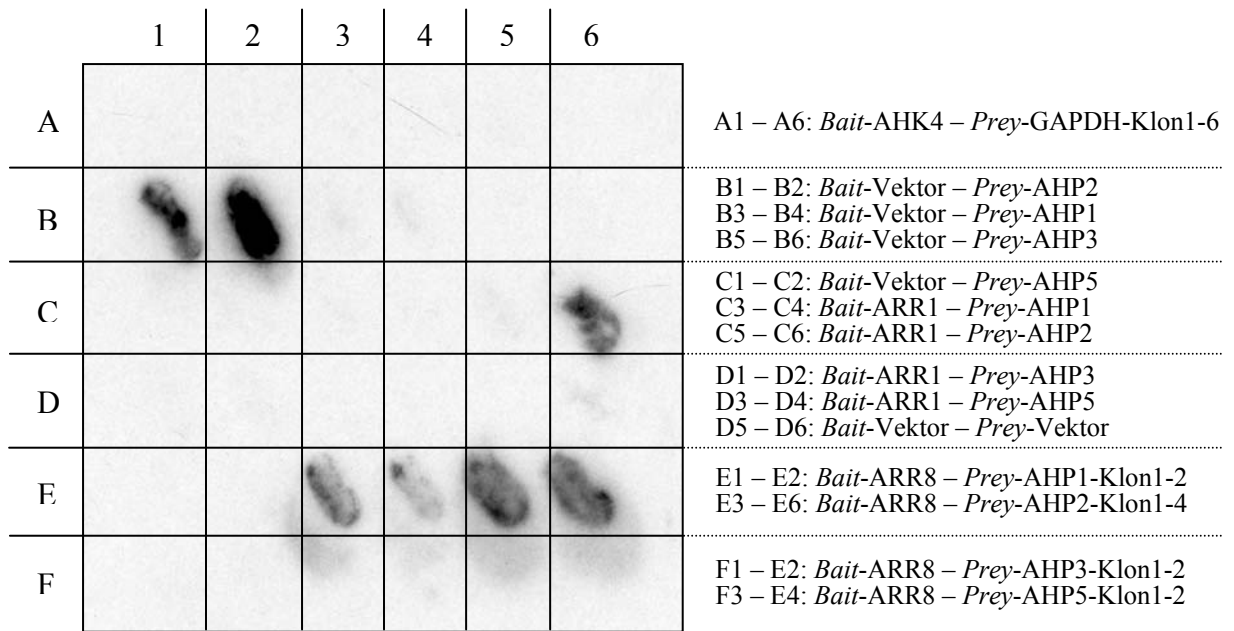


Abbildung 19. *S. cerevisiae* Koloniehybridisierung. Retrafopositive aus den *Library-Screens* wurden direkt auf einer Membran angezogen und anschließend aufgeschlossen. Die freigesetzten Plasmide wurden durch UV-Licht auf der Membran fixiert und anschließend mit einer radioaktiv markierten AHP2-cDNA-Sonde hybridisiert.

3.4.3 *In vitro* Verifizierung einiger in den *Library-Screens* gefundenen neuen Interaktionen

Die Interaktionen AHK2-PI4K β 1 (AT5G64070), AHK2-PI3-/4-K (AT1G26270) wurden nach Literaturrecherchen und die Interaktionen AHK4-AMP-D (AT2G38280), AHK2-ADL1 (AT5G42080), AHK2-UN8 (AT1G69840) und AHK2-UN13 (AT1G17100) zufällig ausgewählt. Diese Interaktionen wurden mittels des *in vitro* Interaktionstests (Kapitel 2.6.8) untersucht. Hierzu wurde der cytoplasmatische Teil der Proteine AHK2 und AHK4 als GST-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (Kapitel 3.2.5) und ihre Partnerproteine in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert (Kapitel 2.6.8). Die Interaktionen AHK2-PI4K β 1, AHK2-ADL1 und AHK4-AMP-D konnten *in vitro* bestätigt werden (Abbildung 20). Die Testbedingungen für die anderen drei Interaktionen waren möglicherweise zu stringent und müssen in abgeänderter Form wiederholt werden.

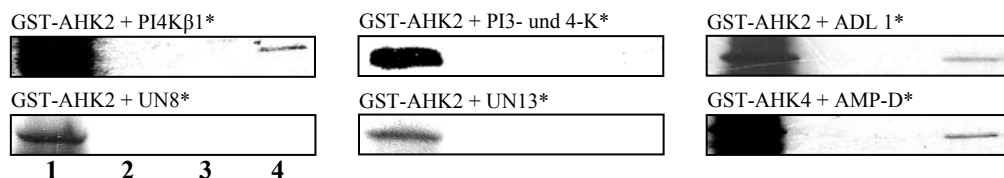


Abbildung 20. Mittels *in vitro* Interaktionstest untersuchte Interaktionen aus den *Library-Screen*. AHK2 und AHK4 wurden als GST-Fusionsprotein an magnetische Glutathion-Kügelchen immobilisiert und mit dem ^{35}S -markierten Partnerprotein inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem SDS-Gel erfolgte die autoradiographische Detektion. (1) ^{35}S -Protein*, (2) Glutathion-Kügelchen + ^{35}S -Protein*, (3) GST an Glutathion-Kügelchen immobilisiert + ^{35}S -Protein* und (4) GST-Fusionsprotein an Glutathion-Kügelchen immobilisiert + ^{35}S -Protein*.

3.4.4 Spezifitätstest zu den Interaktionen AHK2-PI4Kβ1 und AHK4-AMP-D

Mittels des Spezifitätstest sollten die aus den *Library-Screens* gefundenen neuen Interaktionen daraufhin untersucht werden, ob die Interaktionen spezifisch sind. Falls keine Spezifität vorliegt, also eine Interaktion mit allen untersuchten Proteinen vorliegt, spricht man von einem *sticky protein*. Solche Interaktionen sind mit großer Wahrscheinlichkeit falschpositive (Auerbach *et al.*, 2002).

Für den Spezifitätstest wurden die Interaktionen AHK2-PI4Kβ1 und AHK4-AMP-D ausgewählt. Die Interaktion AHK2-ADL1 konnte aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt werden. Die *Prey*-Fusionsproteine PI4Kβ1 und AMP-D wurden auf Interaktion mit den Rezeptoren ETR1, AHK1, AHK2, AHK3 und AHK4 sowie auf Autoaktivierung untersucht. PI4Kβ1 und AMP-D sind keine Autoaktivierer und die Interaktionen mit den Rezeptoren AHK2 und AHK4 sind spezifisch (Abbildung 21). Interaktionen mit AHPs und ARRs wurden ebenfalls nicht identifiziert (Tabelle 25).

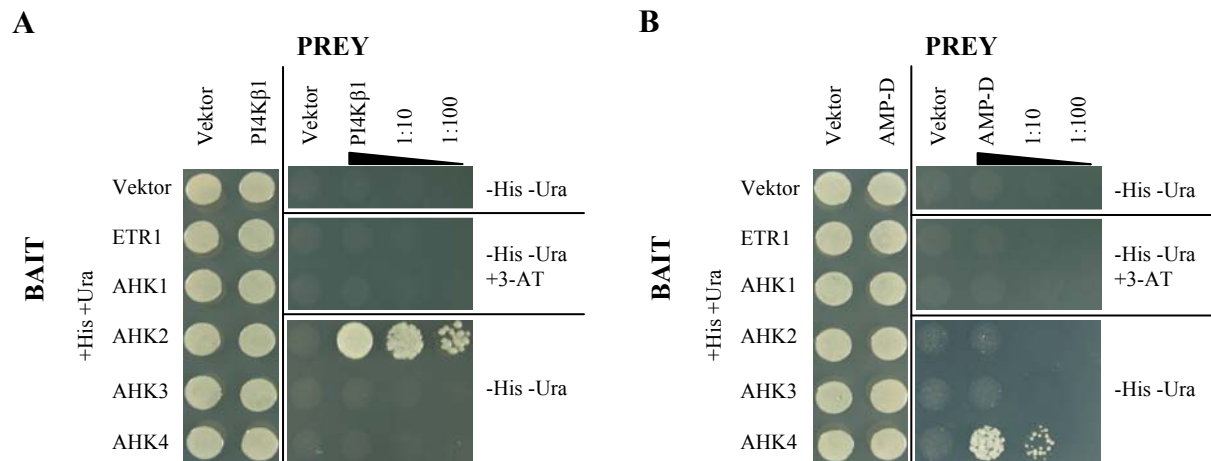


Abbildung 21. Spezifitätstest für die Interaktionen AHK2-PI4Kβ1 und AHK4-AMP-D. PI4Kβ1 und AMP-D wurden als *Prey* gemeinsam mit den *Bait*-Rezeptoren ETR1, AHK1, AHK2, AHK3 und AHK4 in *S. cerevisiae* exprimiert. Jeweils 10 µL der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Kontrollmedium (+His +Ura) und auf Interaktionsmedium (-His -Ura) aufgetragen. Klone mit den autoaktivierenden *Bait*-Rezeptoren ETR1 und AHK1 wurden auf Interaktionsmedium mit 3-AT (5 mM) aufgetragen (-His -Ura +3-AT). Darüber hinaus wurden die Kulturen 1:10 und 1:100 verdünnt und ebenfalls auf die entsprechenden Interaktionsmedien aufgetragen.

Tabelle 25. PI4Kβ1 und AMP-D Spezifitätstest im ZKS von *A. thaliana*. PI4Kβ1 und AMP-D wurden gegen die ZKS-Proteine auf Interaktionen untersucht.

BAIT → PREY ↓	Vektor	AHKs					AHPs	Typ-A ARR								Typ-B ARR				PtyB		
		ETR1	AHK1	AHK2	AHK3	AHK4	AHP5	ARR3	ARR4	ARR5	ARR6	ARR7	ARR8	ARR9	ARR15	ARR16	ARR1	ARR2	ARR10		ARR14	
Vektor																						
PI4Kβ1				■																		
AMP-D						■																

■ - 3-AT unterdrückte Baits ■ - Interaktionen

3.4.5 Kartierung der Interaktionsdomänen für die Interaktion AHK2-PI4Kβ1

Die aus den *Library-Screens* ausgewählten Interaktionen AHK2-PI4Kβ1 und AHK4-AMP-D konnten im *in vitro* Interaktionstest bestätigt und mittels des Spezifitätstests auf ihre Spezifität innerhalb des ZKS untersucht werden. Darüber hinaus stellte sich die Frage, welche der funktionellen Domänen dieser untersuchten Proteine für die Interaktionen zuständig sind. Hierzu wurden die Proteine in ihre funktionellen Domänen unterteilt und erneut auf Interaktion mit ihren Partnerproteinen untersucht. Aus zeitlichen Gründen wurde nur die Interaktion AHK2-PI4Kβ1 untersucht. Für die cytoplasmatische Domäne des Cytokininrezeptors AHK2 wurden bereits Deletionskonstrukte hergestellt (Kapitel 3.3), die der Übersichtlichkeit halber noch einmal in Abbildung 22 dargestellt sind.

Die *in silico* Analyse mittels des Computerprogrammes „SMART“ (Letunic *et al.*, 2004) zeigte, dass die PI4Kβ1 (Abbildung 22A) insgesamt 1121 AS umfasst und am C-terminalen Ende für die PI3Kc-Domäne (AS 860-1119) kodiert. PI4Kβ1 steht für Phosphatidylinositol 4-Kinase und ist ein Enzym, das Phosphatidylinositole phosphoryliert (Müller-Röber und Pical, 2002; Jung *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 1999; Westergren *et al.*, 1999).

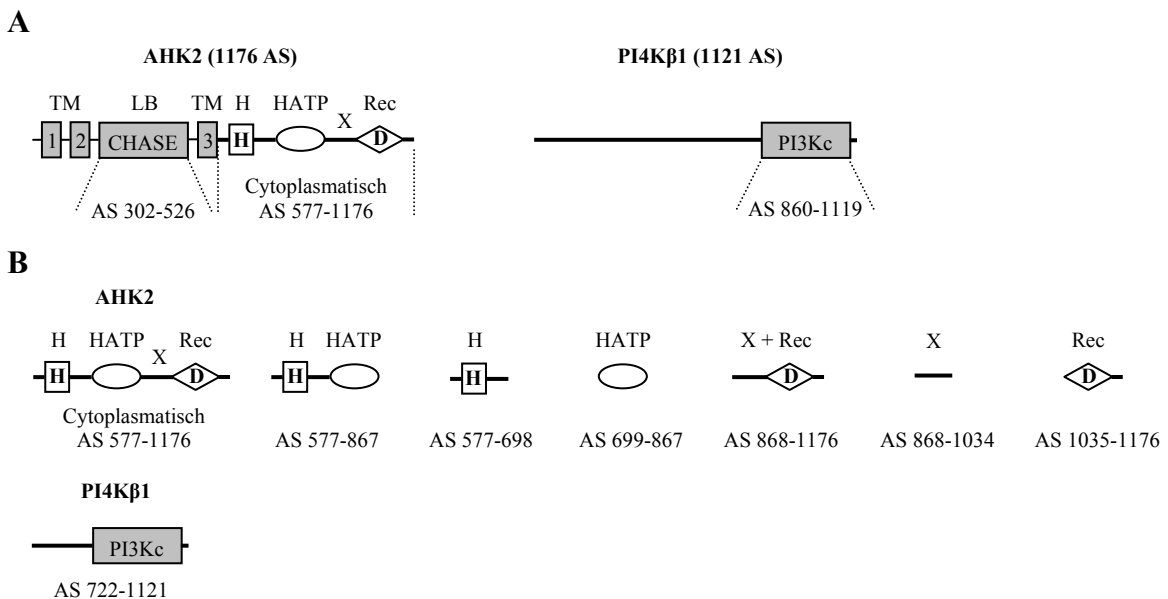


Abbildung 22. Schematische Darstellung der interagierenden Proteine AHK2 und PI4Kβ1 und die Unterteilung in ihre funktionellen Domänen. (A) Die Position der funktionellen Domänen für den Cytokininrezeptor AHK2 und die Phosphatidylinositolkinase PI4Kβ1 wurden schematisch dargestellt. (B) Für die Kartierung der Interaktionsdomänen wurden AHK2-Deletionskonstrukte hergestellt und diese auf Interaktion mit dem aus den *Screens* gezogenem PI4Kβ1-Klon untersucht. Die AS-Zahlen geben dabei die Positionen der Domänen im Wildtyp-Protein an. Abkürzungen: AS, Aminosäure; TM, Transmembran-Domäne; LB, Ligandenbinde-Domäne; H, HisKA-Domäne, HATP, HATPase c-Domäne; X, Domäne mit unbekannter Funktion; Rec, *Receiver*-Domäne; PI3Kc, Phosphoinositid 3-Kinase-Domäne; H, Histidin; D, Aspartat.

Das aus den *Library-Screens* identifizierte PI4K β 1-Protein (Abbildung 22B) kodiert nur für den C-terminalen Bereich (AS 722-1121) des vollständigen Proteins und enthält die katalytische PI3Kc-Domäne. Dieses Protein wurde als *Prey* gegen alle Proteine, die durch die *Bait*-AHK2-Deletionskonstrukte (Abbildung 22B) kodiert werden, auf Interaktionen untersucht.

In Abbildung 23 ist das Ergebnis der Kartierung der Interaktionsdomänen für die Interaktion AHK2-PI4K β 1 dargestellt. Aus dieser geht hervor, dass die AHK2-*Receiver*-Domäne mit dem C-terminalen Bereich des PI4K β 1-Proteins, in dem die PI3Kc-Domäne enthalten ist, interagiert.

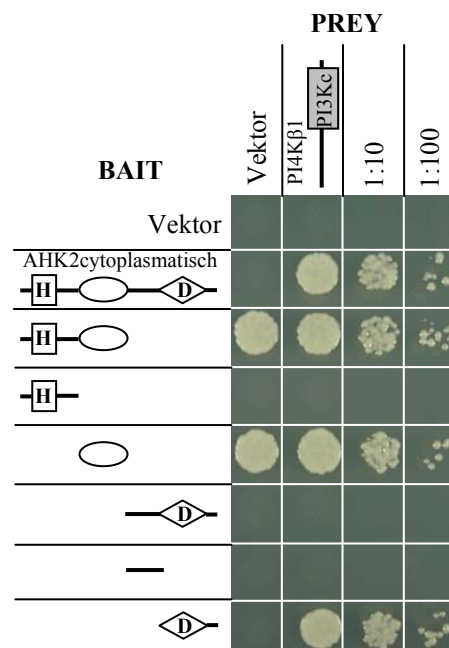


Abbildung 23. Kartierung der Interaktionsdomänen des Rezeptors AHK2 für die Interaktion mit PI4K β 1. Die cytoplasmatische Domäne von AHK2 wurde in Domänen unterteilt und diese jeweils als *Bait* auf Interaktion mit dem aus den *Library-Screens* identifizierten PI4K β 1 untersucht. Jeweils 10 μ L der entsprechenden Kulturen (OD₆₀₀ 0,2) wurden auf Interaktionsmedium aufgetragen. Darüber hinaus wurden die Kulturen 1:10 und 1:100 verdünnt und ebenfalls auf dasselbe Interaktionsmedium aufgetragen.

3.5 Ergebnisse zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mittels der Kopplung von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie

Das *Yeast Two-Hybrid* System bietet nur die Möglichkeit, zwei Proteine auf Interaktionen zu untersuchen. Zahlreiche der in einer Zelle ablaufenden Prozesse basieren aber auch auf Interaktionen von Proteinen, die sich zu einem Proteinkomplex vereinen. Auch im ZKS von *A. thaliana* ist es durchaus möglich, dass die Cytokininsignaltransduktion über Proteinkomplexe

reguliert wird. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, auch Proteinkomplexe im ZKS von *A. thaliana* zu identifizieren. Das *Yeast Two-Hybrid* System ist allerdings hierfür ungeeignet.

Zur Realisierung dieses Zieles wurden die Affinitätschromatographie und die Massenspektrometrie miteinander gekoppelt. Dabei wird das zu untersuchende Protein über einen GST-tag an einer Glutathion-Matrix immobilisiert und anschließend mit Proteinextrakten aus *A. thaliana* inkubiert. Die durch Interaktion gebundenen Proteinkomplexe werden mittels der Massenspektrometrie identifiziert. Diese Methode musste zunächst etabliert werden, um langfristig für verschiedene Proteine Interaktionen identifizieren zu können.

Im Matrix-Ansatz (Kapitel 3.2.4) und mittels des *in vitro* Interaktionstest (Kapitel 3.2.5) konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass AHK3 mit den beiden Rezeptoren AHK2 und AHK4 interagiert. Dieses Resultat war ausschlaggebend bei der Auswahl von AHK3 für die Etablierung der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Proteinkomplexen aus *A. thaliana*.

3.5.1 Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins im großen Maßstab

Für den experimentellen Teil der Arbeit war es zunächst erforderlich das GST-AHK3 Fusionsprotein in großen Mengen zu produzieren. Auf diese Weise sollte ausreichendes Proteinmaterial für die Experimente zur Verfügung stehen. Darüber hinaus sollte durch Inkubation mit hohen Mengen an GST-AHK3 Fusionsprotein die Glutathion-Matrix im Idealfall vollständig benetzt werden.

Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins in verschiedenen E. coli-Expressionsstämmen

Für die Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins wurden drei verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme - B121 (DE) pLysS, B121 Star (DE3) pLysS und Rosetta2 (Kapitel 2.1.1) - untersucht. Die Expression des Proteins erfolgte in 20 mL Kulturen bei 28 °C gemäß Kapitel 2.6.4. Das GST-AHK3 Fusionsprotein wurde mittels magnetischer Glutathion-Kügelchen im *Batch*-Verfahren aufgereinigt (Kapitel 2.6.5) und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke für das GST-AHK3 Fusionsprotein in den *E. coli*-Expressionsstämmen in der Reihenfolge B121 (DE) pLysS, Rosetta2, B121 Star (DE) pLysS zunimmt (Abbildung 24). Nachfolgende Experimente wurden daher mit dem B121 Star (DE) pLysS-Stamm durchgeführt.

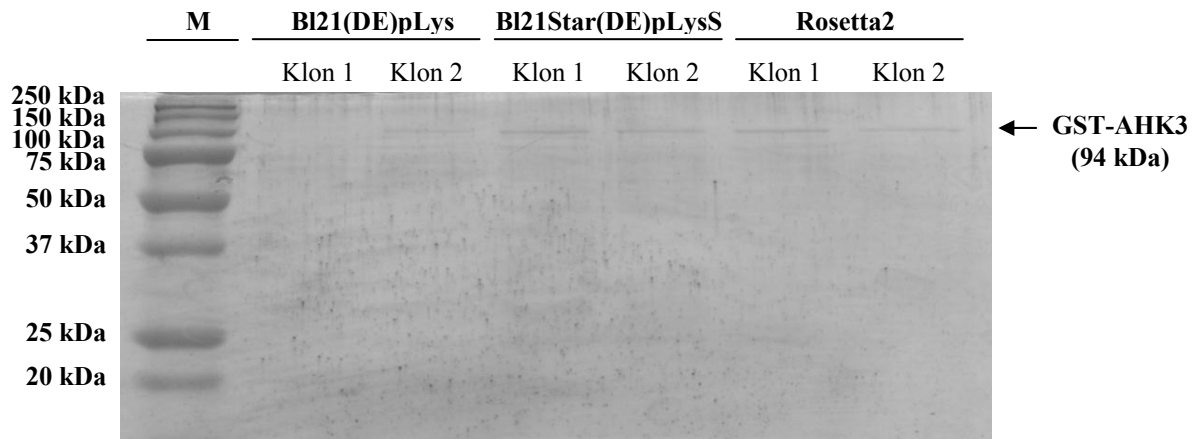


Abbildung 24. Aufreinigung des GST-AHK3 Fusionsproteins aus drei verschiedenen Expressionsstämmen. Die Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins erfolgte in jeweils zwei verschiedenen Klonen der *E. coli* Expressionsstämme BI21(DE)pLysS, BI21Star(DE)pLysS und Rosetta2. Die Aufreinigung von GST-AHK3 erfolgte mittels magnetischer Glutathion-Kügelchen. Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung des eluierten Proteins in einem SDS-Gel. Abkürzungen: M, Proteinmarker.

Optimierung der Parameter zur Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins

In diesem Ansatz sollten die Bedingungen zur Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins im BI21Star(DE)pLysS-Stamm optimiert werden. Hierzu wurden durch Kombination der Parameter Temperatur, IPTG-Konzentration, Induktionszeit und Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion insgesamt 16 verschiedene Expressionsbedingungen untersucht. Die Expression des Proteins erfolgte in 20 mL Kulturen. Bei Wachstum bei 28 °C, einer OD₆₀₀ von 0,4 und einer Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG für 2 h, konnte die höchste Proteinausbeute erzielt werden (Abbildung 25). Diese Bedingungen wurden für die nachfolgenden Experimente übernommen.

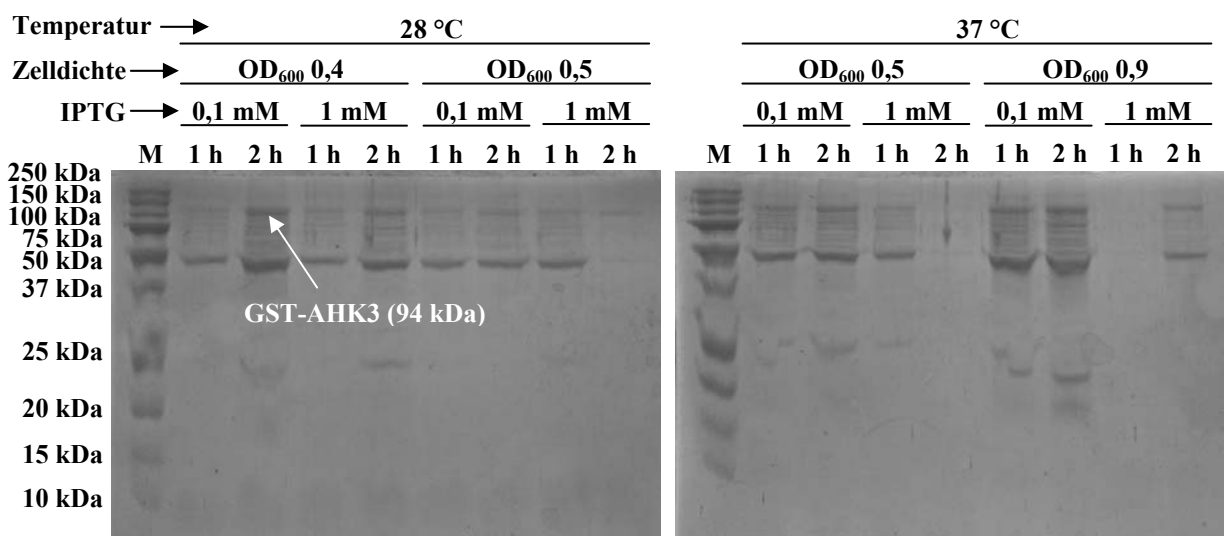


Abbildung 25. Optimierung der Expressionsbedingungen für das GST-AHK3 Fusionsprotein. GST-AHK3 wurde im BI21Star(DE)pLysS-Stamm unter verschiedenen Bedingungen exprimiert. Die Proteinexpression erfolgte bei 28 °C oder 37 °C und bei einer Zelldichte (OD₆₀₀) von 0,4, 0,5 oder 0,9 durch Induktion mit 0,1 mM oder 1 mM IPTG für eine (1 h) oder zwei Stunden (2 h). Das GST-AHK3 Fusionsprotein wurde mittels magnetischer Glutathion-Kügelchen aufgereinigt und mit einem Proteinmarkert (M) im SDS-Gel aufgetrennt.

Expression und Aufreinigung des GST-AHK3 Fusionsproteins im großen Maßstab

Nach Optimierung der Expressionsbedingungen für das GST-AHK3 Fusionsprotein erfolgte die Produktion des Proteins im großen Maßstab, indem das Kulturvolumen von 20 mL auf 200 mL erhöht wurde. Hierzu wurden drei Expressionsansätze unter den zuvor beschriebenen optimierten Expressionsbedingungen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, wie sich ein *Upscaling* auf die GST-AHK3 Proteinausbeute auswirkt. Im ersten Expressionsansatz wurde das Proteinextrakt aus insgesamt zehn 20 mL Kulturen und im zweiten Expressionsansatz aus zwei 100 mL Kulturen vereiniget. Im dritten Ansatz erfolgte die Expression in einem Kulturvolumen von 200 mL. Die Aufreinigung des GST-AHK3 Fusionsproteins erfolgte gemäß Kapitel 2.6.5 mittels der FPLC (Abbildung 26).

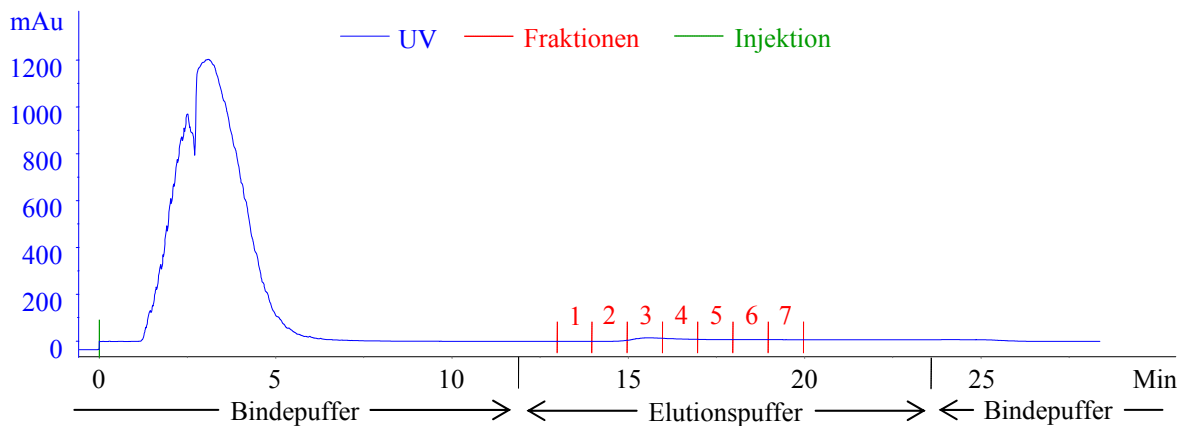


Abbildung 26. FPLC-Chromatogramm der GST-AHK3 Aufreinigung. In diesem Chromatogramm ist der zeitliche Verlauf der GST-AHK3 Aufreinigung gegen die UV-Absorption bei 280 nm (mAu = Milli Absorption Units) abgebildet. Kontaminierende Proteine werden innerhalb von 5 min mittels Bindepuffer von der GST-Säule gewaschen. Nach 12 min erfolgt die Elution des GST-AHK3 Fusionsproteins mittels Elutionspuffer. Das Protein wird in 1 mL-Fraktionen gesammelt.

Der Erfolg der FPLC-Aufreinigung wurde überprüft, indem 30 μ L aus den jeweiligen Fraktionen in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden (Abbildung 27). Das GST-AHK3 Fusionsprotein befindet sich beim ersten (10x 20 mL Kulturen) und zweiten (2x 100 mL Kulturen) Expressionsansatz in den Fraktionen 3 – 6 und beim dritten Expressionsansatz (1x 200 mL) in den Fraktionen 2 - 5. Die FPLC-Aufreinigung war für alle drei Expressionsansätze erfolgreich und ein *Upscaling* hatte keinen Einfluss auf die Proteinausbeute. Deshalb wurde das GST-AHK3 Fusionsprotein bei den nachfolgenden Experimenten in einem Kulturvolumen von 200 mL exprimiert.

Das GST-AHK3 Fusionsprotein liegt nach der FPLC-Aufreinigung im FPLC-Elutionspuffer vor. Das reduzierte Glutathion im Elutionspuffer hat eine höhere Affinität zur Glutathion-Matrix als der GST-tag des Fusionsproteins, so dass das Protein nicht immobilisiert werden kann. Das nächste Ziel war daher die Entfernung des reduzierten Glutathions aus dem

FPLC-Elutionspuffer. Dieses sollte durch Austausch des Elutionspuffers nach einer Aufkonzentrierung (Kapitel 2.6.5) oder durch eine Dialyse (Kapitel 2.6.5) der FPLC-aufgereinigten Proteinprobe realisiert werden. Das GST-AHK3 Fusionsprotein konnte auch nach Durchführung dieser Methoden nicht an der Glutathion-Matrix gebunden werden.

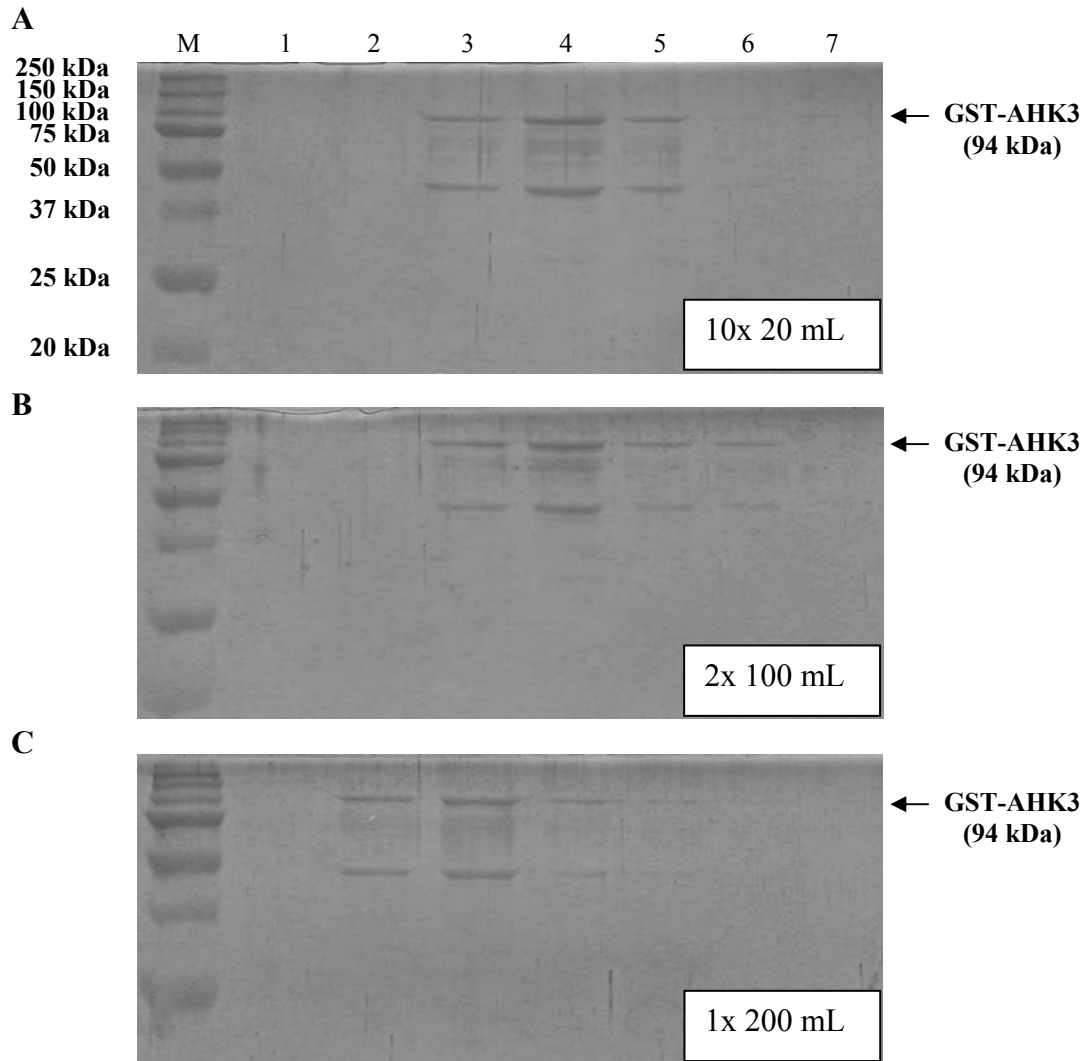


Abbildung 27. Upscaling und FPLC Aufreinigung des GST-AHK3 Fusionsproteins. Das *Upscaling* der Expression für das GST-AHK3 Fusionsprotein erfolgte schrittweise durch Erhöhung der Kulturvolumina. 40 μ L aus den FPLC-aufgereinigten Fraktionen 1 – 7 wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. **(A)** Expression in zehn 20 mL-Kulturen (10x 20 mL). **(B)** Expression in zwei 100 mL-Kulturen (2x 100 mL). **(C)** Expression in einem Kulturvolumen von 200 mL (1x 200 mL). Abkürzungen: M, Proteinmarker; 1-7, Fraktion 1 bis Fraktion 7

In diesem Kapitel konnte insgesamt gezeigt werden, dass durch die Verwendung von verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen, durch Optimierung der Expressionsbedingungen und durch *Upscaling* des Expressionsvolumens eine Zunahme der Proteinausbeute erreicht werden konnte. Mittels der FPLC-Aufreinigung wurde das GST-AHK3 Fusionsprotein aufgereinigt, das reduzierte Glutathion im FPLC-Elutionspuffer konnte aber weder durch Aufkonzentrierung noch durch Dialyse entfernt werden und verhinderte die Immobilisierung

des Proteins an der Glutathion-Matrix. Bei den nachfolgenden Experimenten erfolgte die Immobilisierung des Proteins an der Glutathion-Matrix direkt nach Aufschluss der Expressionskultur.

3.5.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus *A. thaliana* mittels des Cytokininrezeptors AHK3

Für die Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus *A. thaliana* wurde das GST-AHK3 Fusionsprotein direkt nach Aufschluss der Expressionskultur an die Glutathion-Matrix immobilisiert und dieses anschließend mit dem Proteinextrakt aus *A. thaliana* inkubiert.

Hierzu wurden zwei Parallelansätze durchgeführt und für jeweils jeden Ansatz das GST-AHK3 Fusionsprotein in drei 200 mL-Kulturen exprimiert. Nach Vereinigung der Zellysate wurde das Protein an 400 μ L Glutathion-Matrix immobilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des einen Ansatzes mit dem Proteinextrakt aus *A. thaliana* (Kapitel 2.6.9). Der Parallelansatz wurde im Extraktionspuffer ohne Pflanzenextrakt inkubiert. Die gelelektrophoretische Analyse in einem kleinen SDS-Gradientengel zeigte, dass das GST-AHK3 Fusionsprotein sowohl nach Inkubation im Extraktionspuffer als auch nach Inkubation mit dem Pflanzenextrakt an der Glutathion-Matrix immobilisiert vorlag (Abbildung 28). Die Inkubation mit dem Pflanzenextrakt führte zur Abnahme der Menge an immobilisiertem GST-AHK3 Fusionsprotein (Abbildung 28).

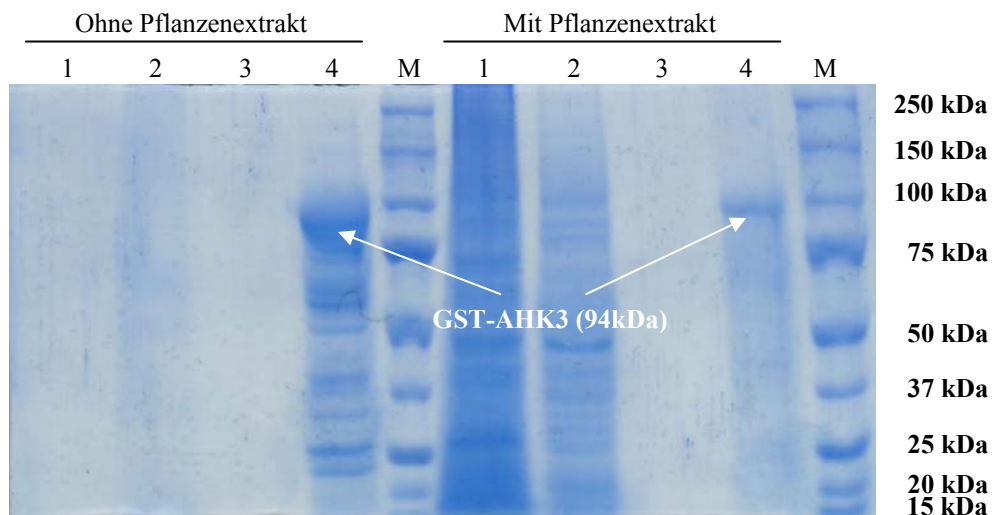


Abbildung 28. Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus *A. thaliana* mittels des GST-AHK3 Fusionsproteins. Das GST-AHK3 Fusionsprotein wurde in drei 200 mL Kulturen exprimiert und mittels 400 μ L magnetischer Glutathion-Kügelchen immobilisiert. Im ersten Ansatz wurde das immobilisierte Protein nur mit dem Extraktionspuffer und im zweiten Ansatz mit dem Proteinextrakt aus *A. thaliana* inkubiert. Jeweils 40 μ L wurden (1) aus dem Überstand, (2) nach dem ersten Waschschritt, (3) nach dem vierten Waschschritt und (4) aus dem Eluat gemeinsam mit dem Proteinmarker (M) in einem kleinen SDS-Gradientengel aufgetrennt.

Mittels des Western-Transfers und einem Anti-GST Antikörper (Kapitel 2.6.6) konnte das GST-AHK3 Fusionsprotein immunologisch nachgewiesen und gleichzeitig die Abnahme der Signalstärke im Ansatz „Mit Pflanzenextrakt“ bestätigt werden (Abbildung 29). Für den Ansatz „Ohne Pflanzenextrakt“ ist bei ca. 94 kDa ein intensives GST-AHK3-Signal zu erkennen. Unterhalb dieses Signals sind weitere zu erkennen, die darauf zurückzuführen sind, dass das GST-AHK3 Fusionsprotein durch Proteasen degradiert oder unvollständig synthetisiert wurde. Im Ansatz „Mit Pflanzenextrakt“ ist bei ca. 94 kDa ebenfalls das Signal für das GST-AHK3 Fusionsprotein zu sehen, jedoch mit einer geringeren Intensität als im Ansatz „Ohne Pflanzenextrakt“. Eine mögliche Begründung hierfür wäre, dass im Pflanzenextrakt Komponenten enthalten sind, die die Glutathion-Matrix partiell reduzieren und somit das GST-AHK3 Fusionsprotein sich von ihr löst.

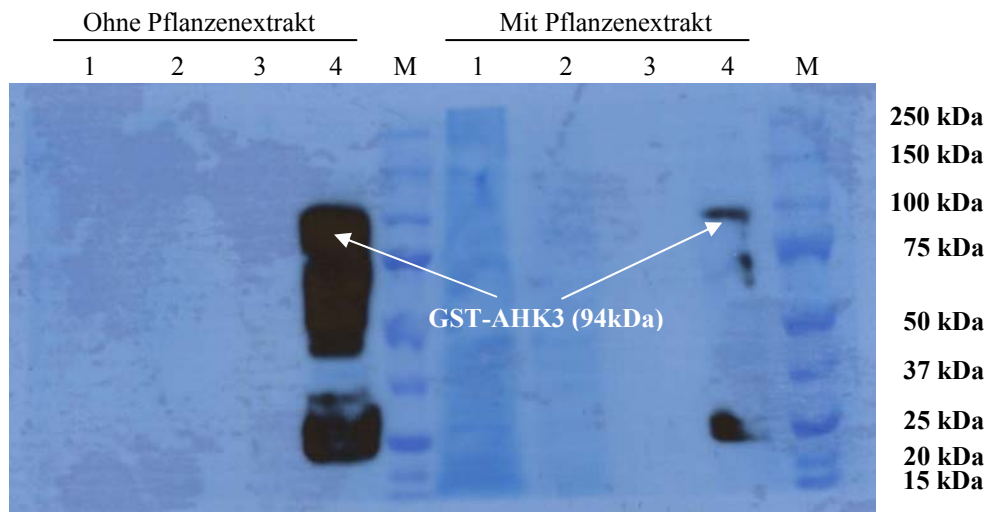


Abbildung 29. Western-Transfer und immunologischer Nachweis des GST-AHK3 Fusionsproteins nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Proteinen aus *A. thaliana*. Das GST-AHK3 Fusionsprotein wurde in einem SDS-Gradientengel aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels eines Anti-GST Antikörpers detektiert. Abkürzungen: M, Proteinmarker; 1, Überstand nach der Inkubation; 2, erster Waschschrift; 3, vierter Waschschrift; 4, Eluat.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus *A. thaliana* wurde wiederholt und das Eluat in einem großen SDS-Gradientengel aufgetrennt (Abbildung 30). In einem kleinen SDS-Gel beträgt das Volumen, das maximal aufgetragen werden kann, 40 μ L, in einem großen SDS-Gel hingegen 150 μ L. Das Auftragen eines größeren Probenvolumens diente gleichzeitig der Erhöhung der Proteinmengen, so dass die Proteine anschließend im Gel durch Färbung besser detektiert werden können. Darüber hinaus sollte im großen Gel aufgrund der längeren Trennstrecke eine bessere Auftrennung der Proteine erzielt werden. Auf diese Weise sollten die interagierenden Proteine sich besser von den Abbauprodukten des GST-AHK3 Fusionsproteins unterscheiden lassen, um diese dann anschließend für die massen-

spektrometrische Analyse aus dem SDS-Gel besser isolieren zu können. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt, dass bei ca. 94 kDa eindeutig eine Proteinbande zu erkennen ist (Abbildung 30). Darüber hinaus konnten fünf weitere Proteinbanden, mit den ungefähren Größen 240 kDa, 75 kDa, 40 kDa, 30 kDa und 16 kDa, detektiert werden. Die Größenangaben für diese Proteine sind nur Näherungswerte, die durch Vergleich mit dem Proteinmarker abgeschätzt wurden.

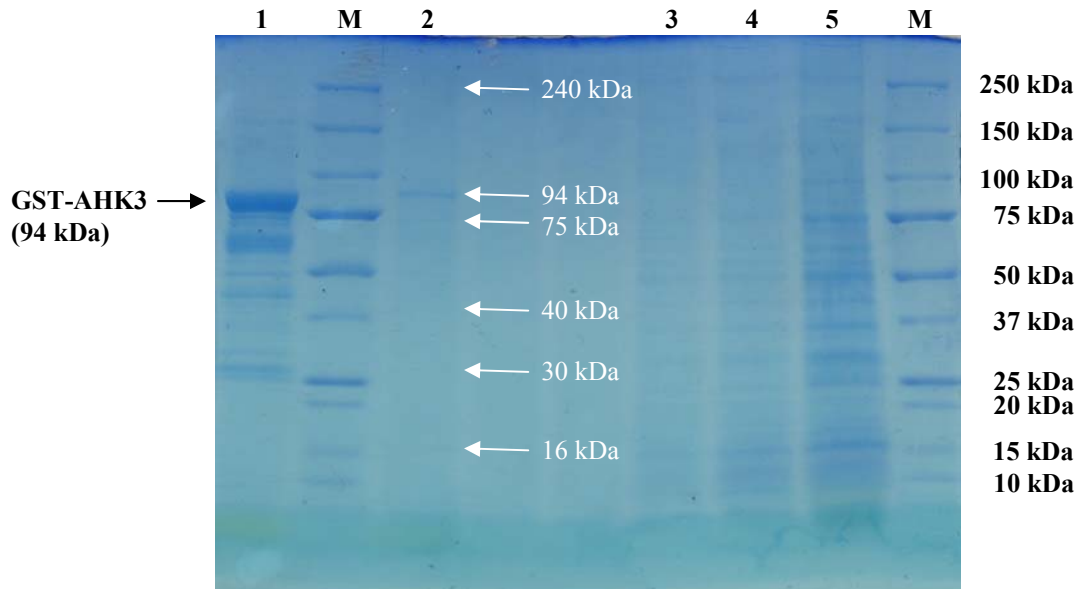


Abbildung 30. Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus *A. thaliana* mittels des GST-AHK3 Fusionsproteins. Das GST-AHK3 Fusionsprotein wurde für zwei Parallelansätze in jeweils drei 200 mL Kulturen im Expressionsstamm B121Star (DE) pLysS exprimiert und anschließend an 400 μ L magnetischer Glutathion-Kügelchen immobilisiert. Im ersten Ansatz wurde das immobilisierte Protein nur mit dem Extraktionspuffer (Spur 1) und im zweiten Ansatz mit dem Proteinextrakt aus *A. thaliana* inkubiert (Spur 2). Beide Ansätze wurden viermal gewaschen und das gesamte Eluat gemeinsam mit dem Proteinmarker (M) in einem großen SDS-Gradientengel aufgetrennt. Darüber hinaus wurden jeweils 50 μ L (Spur 3), 100 μ L (Spur 4) und 150 μ L (Spur 5) aus dem Pflanzenextrakt entnommen und in demselben SDS-Gradientengel aufgetrennt.

3.5.3 Massenspektrometrische Identifizierung affinitätschromatographisch aufgereinigter Proteine

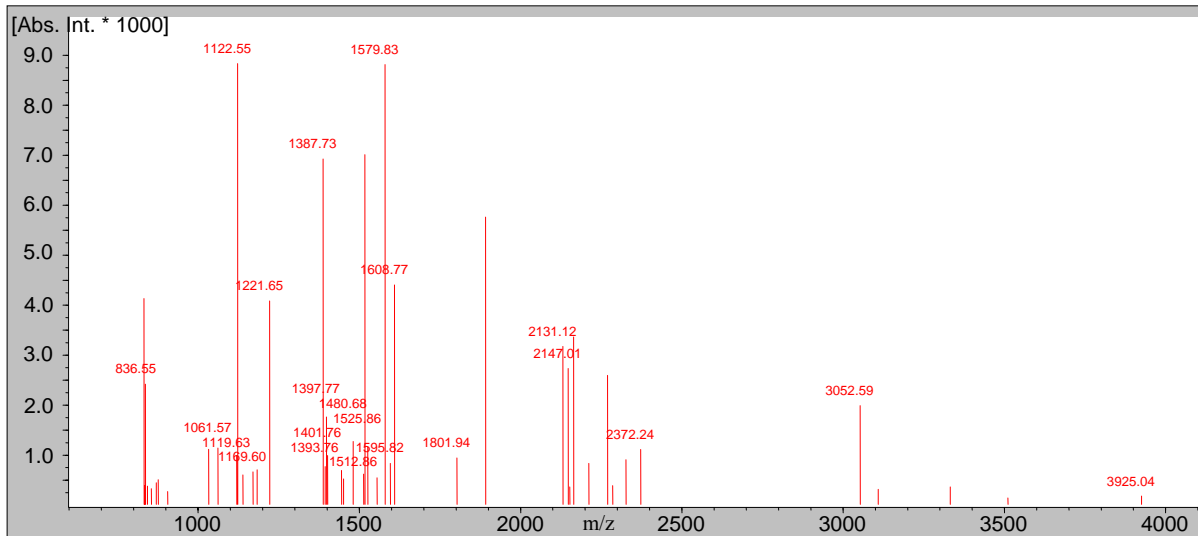
Mittels der Massenspektrometrie sollten die im SDS-Gradientengel (Abbildung 30) aufgetrennten Proteine identifiziert werden. Hierzu wurden diese gemäß Kapitel 2.6.9 aus dem Gel isoliert und nach entsprechender Vorbehandlung massenspektrometrisch identifiziert. Für die Proteine der Größe 94 kDa, 75 kDa, 40 kDa und 16 kDa konnte ein Massenspektrum erhalten werden. Für die Proteine der Größe 240 kDa und 30 kDa konnte jedoch kein Massenspektrum erhalten werden (wahrscheinlich aufgrund zu geringer Proteinmengen).

MS-Analyse des Proteins 94 kDa

In Abbildung 31A ist das MS-Spektrum mit dem charakteristischen Peptidmassenfingerprint (PMF) für das Protein 94 kDa dargestellt. Es konnten 22 Peptidfragmente mit ihren Masse-zu-Ladungszahlen (m/z) ermittelt werden (Abbildung 31A). Die Durchmusterung des PMF in der NCBI-Proteinsequenzdatenbank zeigte, dass es sich bei dem Protein 94 kDa um den Cytokininrezeptor AHK3 handelt. In Abbildung 31B ist die Aminosäuresequenz des vollständigen Cytokininrezeptors AHK3 mit den für die Peptidfragmente identifizierten homologen Bereichen dargestellt. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass es sich bei dem Protein 94 kDa um den vollständigen Rezeptor handelt. Den Hinweis hierfür liefert das Peptidfragment mit der m/z 1801.94. Diese Aminosäuresequenz ist der des Rezeptors AHK3 an der Position 179 – 194 homolog und liegt nicht im C-terminalen cytoplasmatischen Bereich (AS 577-1176), der in dieser Arbeit für die affinitätschromatographische Aufreinigung als GST-Fusionsprotein eingesetzt wurde, sondern im N-terminalen Bereich zwischen den Transmembran-Domänen TM1 (30-47) und TM2 (234-251). Es konnte also somit zum ersten Mal eine Homodimerisierung für den Cytokininrezeptor AHK3 gezeigt werden. Dieses Ergebnis wird gleichzeitig dadurch unterstützt, da das PMF keine Peptidfragmente zeigt, deren Aminosäuresequenzen dem GST-tag des GST-AHK3 Fusionsproteins homolog sind. Eine Reproduktion dieses Ergebnisses konnte aus zeitlichen Gründen nicht vorgenommen werden.

- Ergebnisse -

A



B

AHK3

MSLFHVLGFGVKIGHLFWMLCCWFVSWFVDNGIEDKSGLLVGSVDLEKTKMTTLKKNKMFWFNKISSGLKIPSFYSYQFLGSVKFNKAWWRKLVVVVVVFWLVSIVTFWYFSSQAMEKRKETLASMCDERARMLQDQFNVMNHNQVQAMSILISTFHGKIPSAIDQRTFSEYTDRTSFERPLTSGVAYAMRVLHSEREEFERQQGWTIRKMYSLQNPVHKDDYDLEALEPSPVQEEYAPVIFAQDTVSHVSLDMLSGKEDRENVLRARSSGKGVLTAPFLIKTNRGLVILTFAVYKRDLPASNATPKERIEATNGYLGGVFDIESLVENLLQQLASKQTIILVNVYDITNHSQPI SMYGTNVSADGLERVSPLIFGDPLRKHEMRCRFKQKPPWPVLSMVTSGILVIALLVVAHI IHATVSR IHKVEEDCDKMKQLKKK [AEAADVAKSQFLATVSHEIRTPMNGVLGMLHMLMDTELDVTDQDYVRTAQASGKALVSLINEVLDQAKIESGKLELEEVRFDLRGILDDVLSLFSKQSQKGVELAVYISDRVPDMLIGDPGRFRQILTNLMGNSIKFTEKGHIFVTVHLVDELFESEDGETASSPESTLSGLPVADRQRSWENFKAFSSNGHRSFEPSPDINLIVSVEDTGVGIPVEAQSRIFTPFMQVGPSISRTHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFSSTPKVGSTFTTAVFSNGMQPAERKNDNNQPIFSEFRGMKAVVVDHRPARAKVSWYHFQRLGIRVEVVRVEQALHYLKI GTTTVMILIEQEIWNREADDFIKKLQKDPFLSPKLILANSVESSISEALCTGIDPPIVIVKPLRASMLAATLQRLGIGIREPPQHKGPPALILRNLLGRKILIVDDNNVNLRAAGALKKYGADVCAESGKATISLLKPPHEFDACFMDIQMPEDMDFEATRIRDMEEEMNKRIKNGEALIVENGKTSWHLVPLAMTADVIQATHEECLKCGMDGYVSKPFAEQLYREVSRRFFNSPSDTE]

Start – Ende	M/Z	Sequenz
179 – 194	1801.94	TSFERPLTSGVAYAMR
452 – 463	1387.73	SQFLATVSHEIR
498 – 511	1512.86	ALVSLINEVLDQAK
512 – 523	1401.76	IESGKLELEEVRF
528 – 540	1393.76	GILDDVLSLFSKQ
545 – 555	1221.65	GVELAVYISDR
545 – 566	2372.24	GVELAVYISDRVPDMLIGDPGR
556 – 566	1169.60	VPDMLIGDPGR
585 – 621	3925.04	GHIFVTVHLVDELFESEDGETASSPESTLSGLPVADR
638 – 666	3052.59	SFEPSPDINLIVSVEDTGVGIPVEAQSRIFTPFMQVGPSISR
667 – 680	1579.83	IFTPFMQVGPSISR
667 – 680	1595.82	IFTPFMQVGPSISR
711 – 730	2147.01	VGSTFTTAVFSNGMQPAER
731 – 743	1608.77	KNDNNQPIFSEFR
732 – 743	1480.68	NDNNQPIFSEFR
747 – 756	1119.63	AVVVDHRPAR
759 – 766	1122.55	VSWYHFQR
786 – 803	2131.12	IGTTVMILIEQEIWNRE
854 – 863	1061.57	ASMLAATLQR
877 – 884	836.55	GPPALILR
891 – 903	1525.86	KILIVDDNNVNLRA
892 – 903	1397.77	ILIVDDNNVNLRA

Abbildung 31. Massenspektrometrische Identifizierung des Proteins 94 kDa. (A) Peptidmassenfingerprint des unbekanntes Proteins 94 kDa. **(B)** Aminosäuresequenz des vollständigen Cytokininrezeptors AHK3. Die rote Schriftfarbe markiert die homologen Bereiche im AHK3-Protein. Die eckigen Klammern in Blau markieren den cytoplasmatischen Teil des Cytokininrezeptors AHK3.

MS-Analyse des Proteins 75 kDa

Das MS-Spektrum mit dem charakteristischen PMF für das Protein 75 kDa zeigt, dass für mehr als 20 Peptidfragmente die m/z identifiziert werden konnten (Abbildung 32). Bei der Durchmusterung des PMF in der NCBI-Proteinsequenzdatenbank wurde kein Protein mit homologer Sequenz gefunden. Mittels der MS/MS in Tandem-Anordnung wurden alle Peptidfragmente aus dem PMF weiter untersucht, indem diese jeweils weiter fragmentiert (das Ergebnis ist ein Fragmentationenfingerprint) und die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen erneut in der NCBI-Proteinsequenzdatenbank durchgemustert wurden.

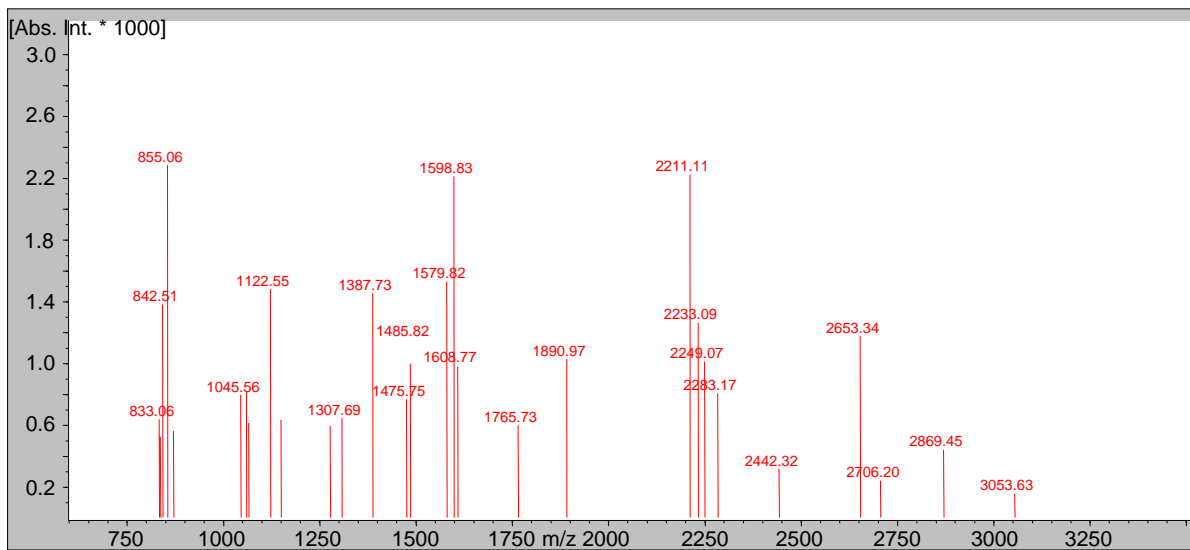
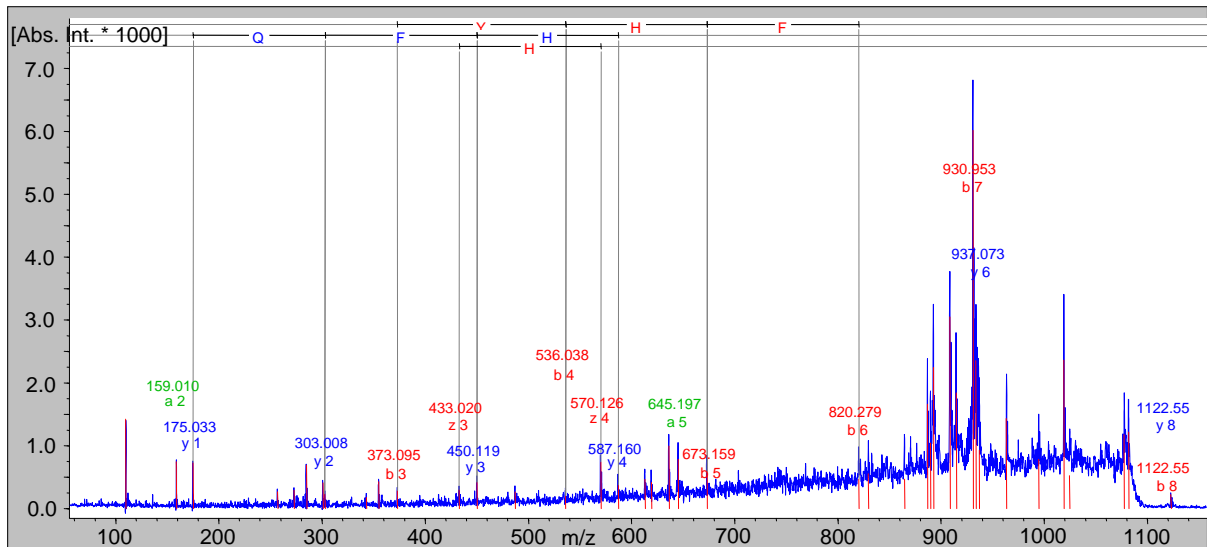


Abbildung 32. Massenspektrometrische Identifizierung des Proteins 75 kDa. In dieser Abbildung ist der Peptidmassenfingerprint des unbekannten Proteins 75 kDa dargestellt.

Es konnte nur für das Peptidfragment mit der m/z 1122.55 ein Fragmentationenfingerprint erhalten werden (Abbildung 33A), für dessen Aminosäuresequenz der Rezeptor AHK3 mit homologer Sequenz an der Position 759 – 766 gefunden wurde (Abbildung 33B). Dieser Bereich liegt innerhalb der cytoplasmatischen Domäne und deutet auf eine potentielle Homodimerisierung des Cytokininrezeptors AHK3.

A



B

AHK3

MSLFHVLGFGVKIGHLFWMLCCWFVSWFVDNGIEDKSGLLVGSVGDLEKTKMTTLKKNKMWFWNKISSGLKIPSFYSYQFLGSVKFNKAWWRKLVVVVWVFWVLVSIWTFWYFSSQAMEKRKETLASMCDERARMLQDQFNVMNMQAMSILISTFHGGKIPSAIDQRTFSEYTDRTSFERPLTSGVAYAMRVLHSEREEFERQQGWTIRKMYSLQNPVHKDDYDLEALEPSPVQEEYAPVIFAQDTVSHVSLDMLSGKEDRENVLRARSSGKGVLTAPFP LIKTNRLGVIILTFAYVKRDLPSNATPKERIEATNGYLGGVFDIESLVENLLQQ LASKQTIILVNVYDITNHSQPI SMYGTNVSADGLERVSPLIFG DPLRKHEMRCRFKQKPPWPVLSMVT SFGILVIALVAHI IATVSR IHKVEEDCDKMKQLKKK [AEAADVAKSQFLATVSH EIRTPMNGVLGMLH MLMDTELDVTQQDYVRTAQASGKALVSLINEVLDQAKIESGKLEEEVRFDLRGLIDDVLSLFSKSKSQKGVELAVYISDRVPDMLIGDPGRFRQ ILTNLMGNSIKFTEKGHIFVTVHLVDELFE SIDGETASSPESTLSGLPVADRQRSWENFKAFSSNGHRSEFSPDPDINLIVSVEDTGVGIPVEAQ SRIFTPFMQVGP SISRTHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFSSTPKVGSTFTFTA VFSNGMQPAERKNDNNQPIFSEFRGMKAVVDHRPARAKV SWYHFQRLGIRVEVPRVEQALHYLKIGTTVMILIEQEIWNREADDFIKKLQKDPFLFSPKLILANSVSESSISEALCTGIDPPIVIVKPLRASMLAATLQRGLGIGIREPPQHKGPALILRNLLGRKILIVDDNNVNLRVAAGALKKYGADVVC AESGKAIKISLLKPPHEFDACFMDIQMPPEMDG FEATRIRIDMEEEMNKRIKNGEALIVENGKTSWHLPLVAMTADVIQATHEECLKCGMDGYVSKPF EAEQLYREVS RFFNSP SDTES]

Start – Ende	M/Z	Sequenz
759 – 766	1122.55	VSWYHFQR

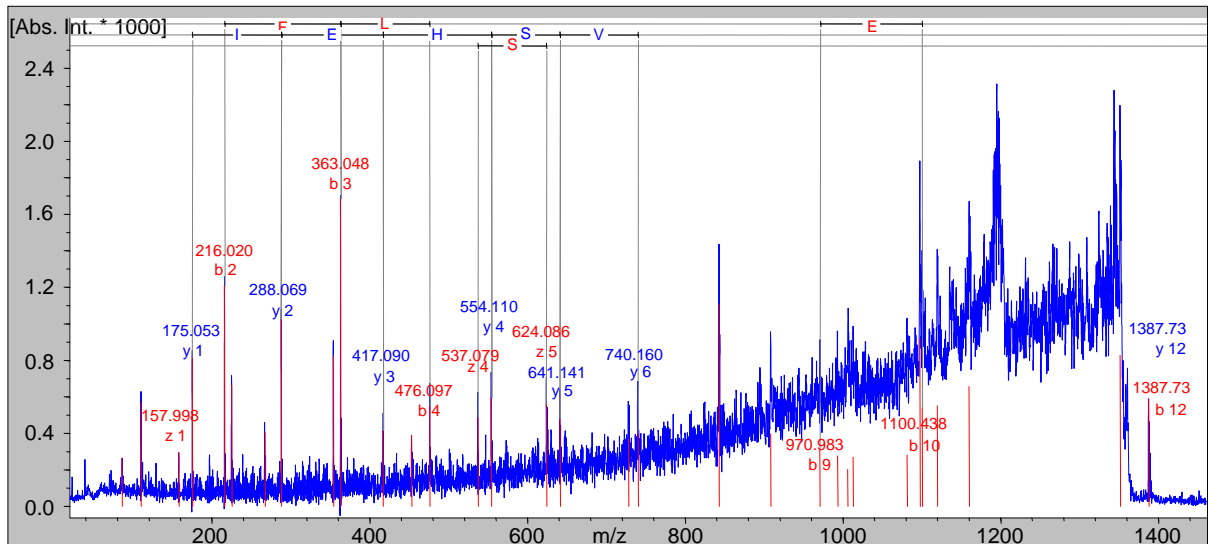
Abbildung 33. MS/MS Analyse des Peptids m/z 1122.55 für das Protein 75 kDa. (A) Fragmentationenfingerprint für das Peptidfragment mit der m/z 1122.55 des unbekannten Proteins 75 kD. **(B)** Aminosäuresequenz des vollständigen Cytokininrezeptor AHK3. Die rote Schriftfarbe markiert den homologen Bereich im AHK3-Protein. Die eckigen Klammern in Blau markieren den cytoplasmatischen Teil des Cytokininrezeptors AHK3.

MS-Analyse des Proteins 40 kDa

Die MS-Analyse für das Protein 40 kDa zeigte ein PMF, für das kein homologes Protein in der NCBI-Proteinsequenzdatenbank identifiziert werden konnte. Mittels der MS/MS Analyse konnte nur für das Peptidfragment mit der m/z 1387.73 ein Fragmentationenfingerprint erhalten werden (Abbildung 34). Die daraus resultierende Aminosäuresequenz zeigte Homologie mit dem Cytokininrezeptor AHK3 an der Position 474 – 485. Diese Sequenz ist in den drei Cytokinin-rezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4 identisch konserviert und liegt innerhalb des cytoplasmatischen Bereiches. Bei dem Protein 40 kDa könnte es sich somit um einen der drei Cytokininrezeptoren handeln. Dies würde bedeuten, dass AHK3 entweder homodimerisiert, oder mit einem der beiden Rezeptoren AHK2 oder AHK4 heterodimerisiert. Die Heterodimerisierung von AHK3 ist durchaus denkbar, da bereits mittels des Matrix-Ansatzes

(Kapitel 3.2.4) und dem *in vitro* Interaktionstest (Kapitel 3.2.5) eine Heterodimerisierung mit beiden Proteinen bestätigt werden konnte. Die Homodimerisierung von AHK3 ist ebenfalls möglich, da dieses bereits für das 94 kDa Protein gezeigt wurde. Erst nach Reproduzierung dieses Ergebnisses lässt sich eine Aussage über die genaue Identität des 40 kDa Proteins machen.

A



B

AHK3

MSLFHVLGFGVKIGHLFWMLCCWFVSWFVDNGIEDKSGLLVGSVGDLEKTKMTTLKKNKMWFWNKISSSGLKIPSFYQFLGSVKFNKAWWRKL
 VVVVVVFWVLVSIWTFWYFSSQAMEKRKETLASMCDERARMLQDFNVSMNHVQAMSILISTFHGKIPSAIDQRTFSEYTDRTSFERPLTSGVA
 YAMRVLHSEREEFERQQGWTIRKMSLEQNPVHKDDYDLEALEPSPVQEEYAPVIFAQDTVSHVVSLDMLSGKEDRENVLRARSSGKGLTAPFP
 LIKTNRLGVILTFVAYKRDLPNSNATPKERIEATNGYLGGVDFDIESLVENLLQQLASKQTIILVNVYDITNHSQPI SMYGTNVSADGLERVSPLIFG
 DPLRKHEMRCRFKQKPPWPVLSMVTSGFILVIALVAHI IHATVSR IHKVEEDCDKMKQLKKK [AEAADVAKSQFLATVSHEIRTPMNGVGLMLH
 MLMDELDVTQDYVRTAQASGKALVSLINEVLDQAKIESGKLELEEVRFDLRGILDDVLSLFSSKSQKGVELAVYISDRVPDMLIGDPGRFRQ
 ILTNLMGNSIKFTEKGHIFVTVHLVDELFSIDGETASSPESTLSGLPVADRQRSWENFKAFSSNGHRSFEPSPDINLIVSVEDTGVGIPVEAQ
 SRIFTPVMQVGPSISRTHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFSSTPKVGSFTFTAVFSNGMQPAERKNDNNQPIFSEFRGMKAVVDHRPARAKV
 SWYHFQRLGIRVEVPRVEQALHYLKIGTTVMILIEQEIWNREADDFIKKLQKDPFLFLSPKLILLANSVESSISEALCTGIDPPIVIVKPLRA
 SMLAATLQRLGIGIREPPQHKGPALILRNLLLGRKILIVDDNNVNLRAAGALKKYGADVCAESGIIKATISLLKPPHEFDACFMDIQMPPEMDG
 FEATRRIRDMEEMNKRIKNGEALIVENGKTSWHLPLVLAAMTADVIQATHEECLKCGMDGYVSKPFEAEQLYREVSFRFFNSPSDTE

Start – Ende	M/Z	Sequenz
474 – 485	1387.73	SQFLATVSHEIR

Abbildung 34. MS/MS Analyse des Peptids m/z 1387.73 für das Protein 40 kDa. (A) Ausschnitt des Fragmentationenfingerprints für das Peptidfragment mit der m/z 1387.73 des unbekannten Proteins 40 kD. **(B)** Aminosäuresequenz des vollständigen Cytokininrezeptor AHK3. Die rote Schriftfarbe markiert die homologen Bereiche. Die eckigen Klammern in Blau markieren den cytoplasmatischen Teil des Cytokininrezeptors AHK3.

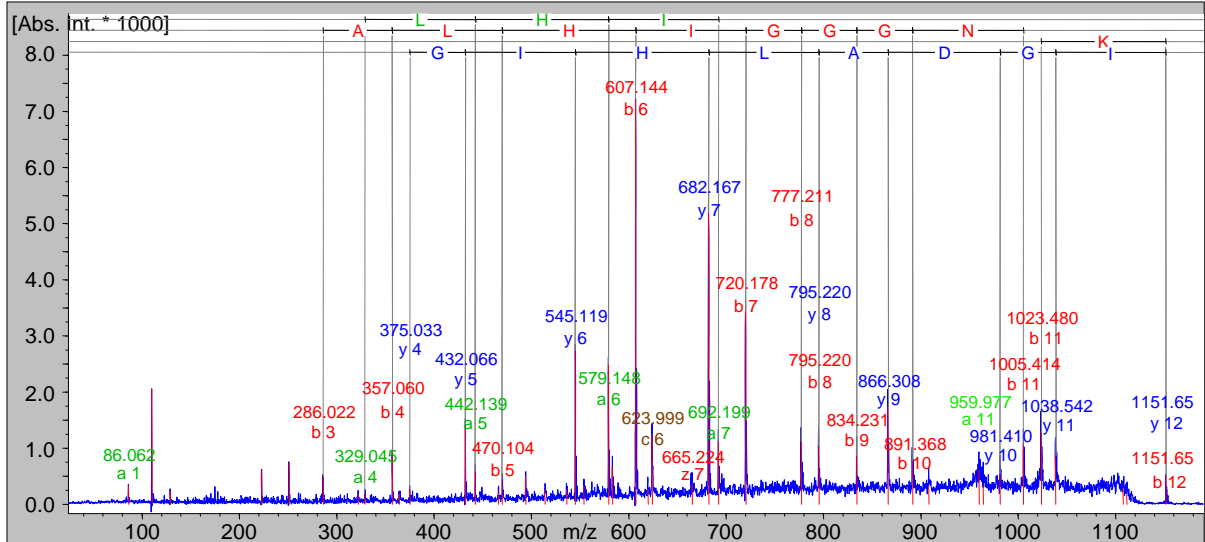
MS-Analyse des Proteins 16 kDa

Für das Protein 16 kDa konnte mittels des PMF kein Protein mit homologer Aminosäuresequenz gefunden werden. Erst mittels MS/MS konnte für das Peptidfragment mit der m/z 1151,65 ein Fragmentationenfingerprint erhalten werden (Abbildung 35A), aus dessen Aminosäuresequenz ein Protein mit homologer Aminosäuresequenz identifiziert werden

- Ergebnisse -

konnte (Abbildung 35B). Bei diesem Protein (AT1G54410) handelt es sich um ein durch Wasserstress induzierbares Protein der Dehydrin-Proteinfamilie.

A



B

Wasserstressinduzierbares Protein der Dehydrin-Proteinfamilie

MAGLINKIGDALHIGGGNKEGEHKKEEEHKKHVDEHKSGEHKEGIVDKIKDKIHGGEGKSHDGEKSHDGEKSKKKDKKEKKHHDDGHSSSSDS
DSI

Start – Ende	M/Z	Sequenz
8 – 19	1151.65	IGDALHIGGGNK

Abbildung 35. MS/MS Analyse des Peptids m/z 1151.65 für das Protein 16 kDa. (A) Ausschnitt des Fragmentationenfingerprints für das Peptidfragment mit der m/z 1151.65 des unbekannten Proteins 16 kD. **(B)** Aminosäuresequenz des Wasserstressinduzierbaren Proteins der Dehydrin-Proteinfamilie. Die rote Schriftfarbe markiert den homologen Bereich in diesem Protein.