

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl eine Ressource an *Arabidopsis thaliana*-Proteinen zu schaffen, als auch Protein-Microarrays herzustellen und diese für funktionelle Studien einzusetzen. Als Plattform für diese funktionellen Analysen wurde die Protein-Microarray Methode gewählt. Diese Methode gehört neben den Macroarrays zu den Arraytechnologien. In beiden Fällen werden Proteine in systematischer Anordnung auf eine Oberfläche gebunden. Diese Technologien, als Weiterentwicklung der DNA Arraytechnologien, machen nun miniaturisierte und parallelisierte funktionelle Studien von Proteinen möglich.

Als Ressource zur Gewinnung von *Arabidopsis thaliana*-Proteinen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei cDNA-Bibliotheken, ausgehend von mRNA aus den Geweben Pistill und Infloreszenz, hergestellt.

Die Pistill cDNA-Bibliothek besteht aus 660.800 Klonen in einem GATEWAY kompatiblen Klonierungsvektor und bildet damit die Grundlage für weitere genomweite Studien in verschiedenen Expressionssystemen.

Die Infloreszenz cDNA-Bibliothek (ATM1) besteht aus 40.000 Klonen in einem Protein Expressionsvektor. Diese Bibliothek wurde, unter Verwendung von Hochdichte Proteinfiltren (Macroarrays), auf proteinexprimierende Klone untersucht. Ausgehend davon wurde eine Proteinexpressions-Unterbibliothek hergestellt. Dieses besteht aus 5.000 Proteinexpressionsklonen. Diese Klone wurden zur weiteren Analyse vom 5'-Ende ansequenziert. Aus diesem Expressionssubset wurde nach umfangreicher bioinformatischer Analyse ein nahezu nicht redundantes, sogenanntes Uniklonset bestehend aus 1.502 Klonen erstellt. Mit diesem nicht redundanten Set sind Analysen mit dem gleichen Informationsgehalt, wie mit der redundanten Proteinexpressions-Unterbibliothek möglich. Dieses Uniklonset (1.502 Klone) wurde für weitere Analysen um 192 vollständige cDNA-Klone erweitert. Alle 1.694 Proteine, die von den Klonen dieses Erweiterten Uniklonsets exprimiert werden, wurden in hohem Durchsatz aufgereinigt.

Als eine erste funktionelle Studie dieser ca. 1.700 *Arabidopsis*-Proteine des Erweiterten Uniklonsets wurde die Phosphorylierung durch zwei *Arabidopsis* MAP-Kinasen unter Verwendung von Protein-Microarrays getestet. Nach Etablierung der ersten pflanzlichen Protein-Microarrays in unserer Arbeitsgruppe (Kersten, Feilner *et*

*al.*, 2003) wurde eine Protein-Microarray basierten Proteomics Methode zur Untersuchung von Gerste Proteinen entwickelt (Kramer, Feilner *et al.*, 2004). Aufbauend auf dieser Methode wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kinase Assay für *Arabidopsis*-Proteine etabliert. Dazu wurden alle ca. 1.700 gereinigten *Arabidopsis*-Proteine auf Nitrozellulose ähnliche beschichtete Microarrays gespottet. Diese wurden zuerst dazu verwendet, um ein Quantifizierungssystem unter Verwendung der Proteinkinase A zu etablieren, welches eine Selektion potentieller Phosphorylierungs-Targets ermöglicht. Mit diesem Quantifizierungssystem wurden dann Microarrays ausgewertet, die mit je einer der beiden *Arabidopsis* MAP-Kinasen 3 (MPK3) und 6 (MPK6) inkubiert worden waren. In diesen Studien wurden aus den ca. 1.700 *Arabidopsis*-Proteinen ca. 50 Targets der MPK3 und ca. 40 Targets der MPK6 identifiziert. Diese Ergebnisse bilden einerseits die Grundlage für zukünftige gezielte *in vivo* Untersuchung der neu identifizierten Targets. Andererseits kann dieser etablierte Phospholierungs-Assay auch für weitere Studien des Erweiterten Unikonsets mit anderen Kinasen, als auch generell für Proteine anderer Herkunft genutzt werden.