

**Protein-Protein-Interaktionen im  
Zweikomponenten-Signalsystem von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Hakan Dortay**

aus Lünen

Mai, 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Disputation am 06.07.2006

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling dafür danken, dass er mir das interessante Thema zur Bearbeitung überlassen hat und meine Arbeit stets durch neue Ideen und unermüdliche Diskussionsbereitschaft unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster bedanke ich mich für seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. Csaba Koncz danke ich für die Verfügungstellung der cDNA-Bank und Herrn Prof. Dr. Erich Wanker für die Überlassung von Plasmiden.

Meinen verbindlichen Dank möchte ich Dr. Alexander Heyl für seine Ideen und seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitstellung von Protokollen und nicht zuletzt für die Motivation und hervorragende Arbeitsatmosphäre aussprechen.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Johan Gobom für die Kollaboration und bei Herrn Dr. Hanjo Hellmann für regelmäßige Diskussionen und Ratschläge.

Bei Dr. Lukas Bürkle, den technischen Assistenten Cordula Braatz, Marion Amende und Rita Fischer sowie Nijuscha Mehnert, Shiang Chun und Mareike Schwerdtner bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Y2H-Experimenten.

Ich danke allen Arbeitskollegen am Institut für Angewandte Genetik für die gute Arbeitsatmosphäre und für die Hilfe bei den praktischen Arbeiten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich während meiner Studienzeit unterstützt haben, und vor allem meiner Ehefrau, die mich während meiner Doktorarbeit in jeder Hinsicht unterstützt hat.

- Inhaltsverzeichnis -

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Zweikomponenten-Signalsystem .....	1
1.2	Cytokininsignaltransduktion in <i>Arabidopsis thaliana</i> durch das ZKS .....	4
1.3	Ziel der Arbeit .....	15
2	Material und Methoden .....	16
2.1	Organismen.....	16
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	16
2.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm .....	16
2.1.3	Pflanzen .....	16
2.2	Nährmedien .....	17
2.2.1	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.2.2	Nährmedien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
2.2.3	Nährmedien für <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.3	Plasmide .....	18
2.4	Oligonukleotide .....	19
2.4.1	Genspezifische und universelle BP-Rekombinationsprimer .....	19
2.4.2	Genspezifische TOPO-Rekombinationsprimer .....	19
2.4.3	Mutageneseprimer .....	19
2.5	Mikrobiologische und gentechnische Methoden.....	19
2.5.1	Kultur und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	19
2.5.2	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	20
2.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Kulturen.....	21
2.5.4	Kultur und Lagerung von <i>S. cerevisiae</i> .....	22
2.5.5	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	23
2.5.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> -Kulturen.....	25
2.5.7	Kultur und Lagerung von <i>A. thaliana</i> .....	26
2.5.8	Isolierung von RNA aus <i>A. thaliana</i> .....	26
2.5.9	Restriktionsfragmentierung von Plasmid-DNA .....	27
2.5.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.5.11	Reverse Transkription von RNA .....	29
2.5.12	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	29
2.5.13	Gelelektrophoretische Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen .....	30
2.5.14	Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren .....	30
2.5.15	Visualisierung und Dokumentation gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA .....	31
2.5.16	Klonierung von PCR-Produkten.....	31
2.5.17	Gerichtete Mutagenese .....	33
2.5.18	Sequenzierung klonierter DNA-Segmente .....	33
2.5.19	Verwendete cDNA-Banken.....	34
2.5.20	Amplifizierung und Aufreinigung von cDNA-Banken .....	34
2.5.21	Verschieben von cDNA-Banken .....	35
2.5.22	Koloniehybridisierung.....	35
2.6	Proteinbiochemische Methoden .....	37
2.6.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	37
2.6.2	Visualisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine.....	38
2.6.3	Dokumentation gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine .....	39
2.6.4	Überexpression von GST und GST-Fusionsproteinen .....	39
2.6.5	Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen.....	41
2.6.6	Western-Blot und immunologischer Nachweis von GST-Fusionsproteinen .....	42
2.6.7	Quantifizierung und Lagerung von Proteinen .....	44
2.6.8	<i>In vitro</i> Interaktionstest.....	44
2.6.9	Affinitätschromatographischer Interaktionstest .....	47

- Inhaltsverzeichnis -

3	Ergebnisse.....	50
3.1	Klonierung der ZKS-Gene .....	50
3.2	Ergebnisse des Matrix-Ansatzes.....	52
3.2.1	Autoaktivierungstest der ZKS-Proteine .....	52
3.2.2	Unterdrückung der Autoaktivierung.....	53
3.2.3	Im <i>Yeast Two-Hybrid</i> System verwendbare ZKS-Proteine.....	54
3.2.4	Interaktionsmatrix der Proteine aus dem ZKS von <i>A. thaliana</i> .....	54
3.2.5	<i>In vitro</i> Verifizierung der im Matrix-Ansatz gefundenen neuen Interaktionen.....	56
3.2.6	Mutationsanalyse der AHP5 Interaktionen im ZKS von <i>A. thaliana</i> .....	59
3.3	Kartierung der Interaktionsdomänen für einige ZKS-Proteine .....	60
3.3.1	Interaktionskartierung des Cytokininrezeptors AHK2.....	62
3.3.2	Interaktionskartierung des Histidinphosphotransmitters AHP5.....	64
3.3.3	Interaktionskartierung des Typ-B Responseregulators ARR14 .....	64
3.3.4	Interaktionskartierung des Typ-A Responseregulators ARR4.....	66
3.4	Ergebnisse der <i>Library-Screens</i> .....	66
3.4.1	<i>Library-Screens</i> im <i>Prey</i> -Vektor pGAD10-GW .....	67
3.4.2	<i>Library-Screens</i> im <i>Prey</i> -Vektor pACT2/pACT2-GW.....	69
3.4.3	<i>In vitro</i> Verifizierung einiger in den <i>Library-Screens</i> gefundenen neuen Interaktionen .....	75
3.4.4	Spezifitätstest zu den Interaktionen AHK2-PI4K $\beta$ 1 und AHK4-AMP-D .....	76
3.4.5	Kartierung der Interaktionsdomänen für die Interaktion AHK2-PI4K $\beta$ 1 .....	77
3.5	Ergebnisse zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mittels der Kopplung von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie.....	78
3.5.1	Expression des GST-AHK3 Fusionsproteins im großen Maßstab .....	79
3.5.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus <i>A. thaliana</i> mittels des Cytokininrezeptors AHK3 .....	83
3.5.3	Massenspektrometrische Identifizierung affinitätschromatographisch aufgereinigter Proteine.....	86
4	Diskussion .....	92
4.1	Protein-Protein-Interaktionen im ZKS von <i>A. thaliana</i> mittels des Matrix-Ansatzes... 93	
4.1.1	Homo- und Heterodimerisierung der Cytokininrezeptoren.....	95
4.1.2	AHP-Proteine als Dreh- und Angelpunkt des ZKS .....	96
4.1.3	Protein-Interaktionen der Responseregulatoren .....	98
4.1.4	Redundanz und Spezifität im ZKS von <i>A. thaliana</i> .....	100
4.2	Kartierung der Interaktionsdomänen für ZKS-Proteine aus <i>A. thaliana</i> .....	101
4.2.1	Interaktionskartierung des Cytokininrezeptors AHK2.....	102
4.2.2	Interaktionskartierung des Histidinphosphotransmitters AHP5 .....	103
4.2.3	Interaktionskartierung des Typ-B Responseregulators ARR14 und des Typ-A Responseregulators ARR4.....	103
4.3	Identifizierung von Protein-Interaktionen des ZKS von <i>A. thaliana</i> mittels der <i>Library-Screens</i> .....	104
4.3.1	Ein Protein-Interaktionsnetzwerk des ZKS aus <i>A. thaliana</i> .....	108
4.3.2	AHK2-PI4K $\beta$ 1 Interaktion .....	111
4.4	Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in <i>A. thaliana</i> durch Kopplung der Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie.....	114
5	Zusammenfassung .....	116
6	Abstract.....	118
7	Literaturverzeichnis .....	120
8	Abkürzungsverzeichnis .....	133
9	Publikationen.....	135
10	Lebenslauf .....	136

- Inhaltsverzeichnis -

11	Anhang .....	137
11.1	Plasmidkarten .....	137
11.2	Genspezifische BP-Rekombinationsprimer.....	139
11.3	Genspezifische TOPO-Rekombinationsprimer .....	140
11.4	Proteinaufreinigungen .....	141