

Analyse der Auxin-bindenden Proteine
AtERabp1 aus *Arabidopsis thaliana*
und
ZmERabp1 aus *Zea mays*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christian Feckler

aus Wissen

Köln 2000

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg

PD Dr. Klaus Palme

Tag der mündlichen Prüfung:

14.02.2001

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Auxin	2
1.2	Auxin-bindende Proteine	6
1.3	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Enzyme	13
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Bakterienstämme	13
2.1.4	Vektoren	13
2.1.5	Geräte	14
2.1.6	Datenverarbeitung	14
2.1.7	Kulturmedien	15
2.1.7.1	Bakterienmedien	15
2.1.7.2	Pflanzenmedien	15
2.1.8	Pflanzen	16
2.2	Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	16
2.2.1	DNA-Präparationen	16
2.2.1.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	16
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über Qiagen-Säulen	16
2.2.2	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA	16
2.2.3	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen	17
2.2.4	Enzymatische Reaktionen mit DNA	17
2.2.4.1	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	17
2.2.4.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	17
2.2.4.3	Auffüllreaktionen einzelsträngiger DNA-5'-Enden	18
2.2.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.2.4.5	DNA-Sequenzierung	18
2.2.4.6	Polymerasekettenreaktion	18
2.2.5	Gelelektrophoretische Methoden	19
2.2.5.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	19
2.2.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.2.6	Northern-Blot	19
2.2.6.1	Trennung und Transfer von RNA	19
2.2.6.2	Radioaktive Markierung von DNA	20
2.2.6.3	Nachweis der filtergebundenen RNA	20

2.2.7	Bakterientransformation	20
2.2.7.1	Präparation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.2.7.2	Elektroporation	21
2.3	Methoden zur Proteinanalyse	21
2.3.1	Präparation pflanzlicher Proteine aus <i>A. thaliana</i>	21
2.3.1.1	Proteinpräparation für SDS-PAGE	21
2.3.2	Methoden zur Konzentrationsbestimmung	21
2.3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bichinonsäure	21
2.3.2.2	Bestimmung der Thiolgruppenkonzentration (Ellmans-Test)	22
2.3.3	TCA-Fällung	22
2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	22
2.3.5	Coomassie-Färbung	23
2.3.6	Silberfärbung	23
2.3.7	Transfer von Proteinen (Western-Blot)	23
2.3.8	Immundetektion von Proteinen	24
2.4	Massenspektrometrische Analyse von ZmERabp1	24
2.4.1	Isolierung von ZmERabp1 aus Maisgewebe	24
2.4.2	Alkylierung von ZmERabp1	25
2.4.3	Tryptischer Verdau	26
2.4.4	Massenspektrometrische Analysen	26
2.4.4.1	Bestimmung der molekularen Masse von ZmERabp1 durch ES-MS	26
2.4.4.2	Analyse der tryptischen Peptide durch LC/ES-MS und MS/MS	26
2.5	Peptidsynthese	26
2.6	Renaturierung von AtERabp1	28
2.6.1	Expression und Extraktion von AtERabp1	28
2.6.2	Gelfiltration auf einer Sephadex G-25-Säule	29
2.6.3	Reinigung über eine Ni-NTA-Säule	29
2.6.4	Renaturierung von AtERabp1	29
2.6.5	Fluoreszenzspektroskopie	29
2.6.6	Berechnung der Dissoziationskonstanten	30
2.7	Antikörperherstellung und Reinigung	32
2.7.1	Kopplung der Peptide an Keyhole Limpet Hemocyanin	32
2.7.2	Immunisierung der Kaninchen	32
2.7.3	Reinigung der Antikörper	32
2.7.3.1	Ammoniumsulfatpräzipitation	32
2.7.3.2	Affinitätschromatographie der Anti-Peptid-Antikörper	32
2.8	Immuncytochemie	33
2.9	Kultivierung von <i>A. thaliana</i> Pflanzen	33
2.9.1	Oberflächensterilisation von Samen	33
2.9.2	Kreuzung der Reporterlinien mit einer Aktivatorlinie	34
2.9.3	Herstellung von Wurzelkulturen	34

2.10	Funktionelle Analyse von ZmERabp1	34
2.10.1	Herstellung von Protoplasten aus Maiskoleoptilen	34
2.10.2	Volumenbestimmung der Protoplasten	35
2.10.3	Wachstumsmessungen von Maiskoleoptilen	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Expressionsanalysen von AtERabp1 in <i>A. thaliana</i>	36
3.1.1	Northern-Blot-Analysen	36
3.1.2	Western-Blot-Analysen	37
3.1.2.1.1	Herstellung eines spezifischen anti-AtERabp1-Peptidantikörpers	38
3.1.2.2	Western-Blot-Analysen von AtERabp1	39
3.1.3	Immunfluoreszenzmarkierung von AtERabp1	40
3.1.3.1	Lokalisierung von AtERabp1 in Wurzeln von <i>A. thaliana</i>	40
3.1.3.2	Lokalisierung von AtERabp1 in Embryonen von <i>A. thaliana</i>	44
3.2	Homologe Expression in <i>A. thaliana</i>	47
3.2.1	Charakterisierung der <i>AtERabp1-sense</i> - und <i>antisense</i> -Pflanzen	48
3.2.1.1	Northern-Blot-Analysen der T2-Generation	48
3.2.1.2	Western-Blot-Analysen der T2-Generation	50
3.3	Massenspektrometrische Analyse von ZmERabp1	51
3.3.1	Analyse der molekularen Masse von ZmERabp1	52
3.3.2	Analyse der Disulfidstruktur von ZmERabp1	54
3.3.2.1	Lokalisierung einer Disulfidbrücke durch spezifische Derivatisierung	54
3.3.2.2	Direkter Nachweis einer Disulfidbrücke	57
3.4	Renaturierung von AtERabp1	61
3.4.1	Expression und Reinigung	61
3.4.2	Renaturierung	62
3.4.3	Fluoreszenzspektroskopie	63
3.4.3.1	Überprüfung der Renaturierung	63
3.4.3.2	Ligamentitration	64
3.5	Funktionelle Untersuchungen von ZmERabp1	68
3.5.1	Auxininduktionsstudien mit Protoplasten	68
3.5.2	Anti-AtERabp1-Peptidantikörper	69
3.5.3	Anti-C-Terminus-Antikörper	73
3.5.4	C-terminales Peptid T11/12 aus Mais	75

4	Diskussion	77
4.1	Expressionsanalyse von AtERabp1	77
4.2	Homologe Expression in <i>A. thaliana</i>	80
4.3	Massenspektrometrische Untersuchung von ZmERabp1	81
4.4	Renaturierung von AtERabp1	84
4.5	Funktionelle Untersuchungen von ZmERabp1	87
4.6	Ausblick	90
5	Zusammenfassung	92
6	Anhang	94
7	Literatur	98

Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit beziehen sich kursiv dargestellte Abkürzungen auf die Nukleotidsequenz (die Unterscheidung zwischen Gen, RNA, cDNA oder Promotor erfolgt durch einen entsprechenden Zusatz); nichtkursive Abkürzungen beziehen sich auf die Proteine. Die verwendete Abkürzung ABP bezeichnet alle bisher charakterisierten, im ER lokalisierten Auxin-bindenden Proteine.

AtERabp1	Auxin-bindendes Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
FrERabp1	Auxin-bindendes Protein aus <i>Fragaria x Ananassa</i>
MdERabp1	Auxin-bindendes Protein aus <i>Malus domestica</i>
NtERabp1	Auxin-bindendes Protein aus <i>Nicotiana tabacum</i>
ZmERabp1	Auxin-bindendes Protein aus <i>Zea mays</i>
ABP	Auxin-bindendes Protein bzw. Auxin-bindende Proteine
ADIS	Automatische DNA-Isolierung und -Sequenzierung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	N ⁶ -Benzylaminopurin
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BY2	Tabaksuspensionszellen (bright yellow 2)
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
Ci	Curie
<i>cDNA</i>	komplementäre DNA
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
cv.	cultivar
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
det.	detektiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
FITC	Fluoresceinthiocyanat
Fmoc	N α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Gruppe

GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Indol-3-essigsäure
IAM	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
kV	Kilovolt
L.	Linné
LC	Flüssigchromatographie
M	Molar
mA	Milliampère
MES	4-Morpholinsäure
Min	Minuten
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
m/z	Quotient aus Masse und Ladung eines Ions
NaAc	Natriumacetat
NAA	Naphthylelessigsäure
NMM	4-Methylmorpholin
NTA	Nitrilotriacetat
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermius
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
PAA	4-Hydroxyphenylelessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

PEG	Polyethylenglykol
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
35S-Promotor	<i>CaMV35S</i> -Promotor (Promotor des Blumenkohlmosaikvirus)
SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
theor.	theoretisch
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UBQ	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
4-VP	4-Vinylpyridin
v/v	Volumen pro Volumen
<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i>
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>

Aminosäuren

A (Ala)	Alanin	N (Asn)	Asparagin
C (Cys)	Cystein	P (Pro)	Prolin
D (Asp)	Asparaginsäure	Q (Gln)	Glutamin
E (Glu)	Glutaminsäure	R (Arg)	Arginin
H (His)	Histidin	S (Ser)	Serin
I (Ile)	Isoleucin	T (Thr)	Threonin
K (Lys)	Lysin	V (Val)	Valin
L (Leu)	Leucin	W (Trp)	Tryptophan
M (Met)	Methionin	Y (Tyr)	Tyrosin

Nukleotide

A	Adenin	dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
C	Cytosin	dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
G	Guanin	dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
T	Thymin	dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
		dNTPs	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate

1 Einleitung

Die Bildung eines vielzelligen Organismus basiert auf der Kommunikation zwischen den differenzierten Einzelzellen der Organe. In den komplexen tierischen Organismen erfolgt diese Kommunikation entweder in Form elektrischer Signale über das Nervenzellsystem oder mittels niedermolekularer Substanzen, Hormone genannt. Diese werden in der Regel in endokrinen Drüsen synthetisiert, in den Blutstrom abgegeben und führen in den Zielzellen zu einer spezifischen Reaktion. In Pflanzen schienen frühe Untersuchungen ein analoges Kommunikationssystem zu belegen. In dem gewählten Untersuchungsobjekt, dem Haferkeimling (*Avena sativa*), wurde ein Gewebe entdeckt, das einen Wachstumsfaktor synthetisiert (Darwin und Darwin, 1881). Dieser Stoff wird von der selbst nicht wachstumsfähigen Koeoptile gebildet und basipetal in die Wachstumszone transportiert, um dort Zellstreckung auszulösen. Der als Auxin bezeichnete Wachstumsfaktor konnte aus Hefe isoliert und einige Jahre später als Indol-3-essigsäure (IAA) identifiziert werden (Went, 1928; Kögl und Kostermans, 1934). Nachdem die Bildung von Auxinen (siehe unten) auch in Pflanzen selbst nachgewiesen wurde, stellte sich heraus, daß Synthese- und Wirkungsort nicht immer streng getrennt sein müssen (Übersicht s. Davies, 1995). Ferner ist Auxin in eine Vielzahl verschiedener Prozesse während des gesamten pflanzlichen Lebenszyklus involviert (Übersicht s. Davies, 1995). Allerdings zeigte sich durch die Isolierung weiterer Botenstoffe, daß erst das Zusammenspiel dieser Stoffe, die sowohl synergistisch als auch antagonistisch wirken können, die Kontrolle der diversen Prozesse erreicht. Obwohl die ursprünglich postulierte Analogie zwischen den pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsfaktoren und den tierischen Hormonen nicht existiert, wird der Begriff Pflanzen- bzw. Phytohormone für diese Stoffe weiterhin verwendet.

Zu den fünf klassischen Phytohormonen werden neben den bereits erwähnten Auxinen Abszissinsäure, Cytokinine, Gibberelline und Ethylen gezählt. Darüber hinaus gibt es eine stetig wachsende Gruppe von Botenstoffen, zu denen neben niedermolekularen Substanzen (Jasmonat, Brassinosteroide, Lipochitooligosaccharide) auch das Peptidhormon Systemin zählt. Alle Substanzen bewirken in geringen Konzentrationen physiologische Effekte (Übersicht s. Davies, 1995). Bis heute sind Auxine die physiologisch am besten untersuchten

Pflanzenhormone. Die molekularen Wirkmechanismen sind dagegen weitgehend unverstanden.

1.1 Auxin

Zu den Auxinen werden sowohl natürlich vorkommende (Indol-3-essigsäure, Indol-3-Buttersäure, 4-Chlorindol-3-essigsäure) als auch synthetisch hergestellte Substanzen (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 1-Naphthylessigsäure) gezählt, die in Konzentrationen von weniger als 10^{-6} M das Streckungswachstum von Sprossen fördern und in denselben Konzentrationen das Längenwachstum von Wurzeln hemmen (Went und Thimann, 1937). Außerdem sind Auxine an nahezu allen Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt, z.B. Wurzelbildung und -entwicklung, Blattentwicklung, Apikaldominanz, Tropismus und Blütenbildung (Übersicht s. Davies, 1995).

Auxinmetabolismus und Auxintransport

Hormonell wirksames Auxin kann auf unterschiedliche Weise gebildet werden. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß es sowohl einen Tryptophan-abhängigen als auch einen Tryptophan-unabhängigen *de novo* Syntheseweg für IAA gibt (Bartel, 1997). Ferner liegt der Großteil von IAA (ca. 95 %) in inaktiver Form konjugiert an Aminosäuren, Peptiden, Zuckern und myo-Inositol vor (Cohen und Bandurski, 1982). Diese Konjugate dienen vermutlich als Speicher- und Transportform zur Aufrechterhaltung der Hormon-Homöostase (Cohen und Bandurski, 1982; Bandurski *et al.*, 1995). Durch hydrolytische Enzyme kann aus diesen Konjugaten biologisch aktives IAA freigesetzt werden (Bartel und Fink, 1995).

Von der Sproßspitze wird Auxin wahrscheinlich im vaskulären Gewebe basipetal, d. h. in Richtung der Wurzel transportiert (Epel *et al.*, 1992). Dabei wird IAA vermutlich apoplastisch von Zelle zu Zelle geleitet (Cande und Ray, 1976). In der Wurzel kann zwischen einem akropetalen Transport zur Wurzelspitze hin und einem basipetalen Transport von der Wurzelspitze weg unterschieden werden (Ohwaki und Tsurumi, 1976; Davies *et al.*, 1976; Tsurumi und Ohwaki, 1978). Diese polaren Auxintransporte können spezifisch durch Auxin-

transportinhibitoren (Phytotropine) gehemmt werden. Bekannte Phytotropine sind 2,3,5-Triiodbenzoesäure (TIBA), Naphthylphthalaminsäure (NPA) und Flavonoide (Christie und Leopold, 1965; Lembi *et al.*, 1971; Jacobs und Rubery, 1988). Die Applikation von TIBA und NPA führt zu einer Akkumulation von IAA in den Zellen (Hertel *et al.*, 1983). Daher wird vermutet, daß TIBA und NPA direkt oder indirekt den Auxin-Efflux-Carrier inhibieren. Störungen dieses polaren Auxintransports äußern sich in einem deutlichen Phänotyp, der charakteristisch für eine Mutation im *PIN-FORMED (PIN1)*-Gen von *A. thaliana* ist (Okada *et al.*, 1991). Mit Hilfe von *En-1*-Insertionsmutanten von *A. thaliana* gelang die Klonierung und Identifizierung der *AtPIN*-Genfamilie, deren Genprodukte wichtige Komponenten des Auxin-Efflux-Carriers darstellen könnten (Gälweiler *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998).

Für die zelluläre Aufnahme von Auxin werden zwei Mechanismen postuliert. Die chemiosmotische Hypothese basiert auf dem Eintritt von IAA in die Zelle durch Diffusion der protonierten, hydrophoben IAA (Übersicht s. Goldsmith, 1977; Rubery, 1987). Bei einem apoplastischen pH-Wert von 5,5 liegen nur ca. 10 % der IAA protoniert vor. Dennoch ist die Aufnahme durch Diffusion signifikant, da IAA im Cytosol (neutraler pH) deprotoniert und somit dem Gleichgewicht entzogen wird (*ion trapping*). Als zweiter Mechanismus wird die Auxinaufnahme durch einen Auxin-Influx-Carrier diskutiert (Goldsmith, 1977; Morris *et al.*, 1991). Dieser Carrier ist durch hohe Auxinkonzentrationen saturierbar; dabei wird vermutlich das IAA-Anion zusammen mit zwei Protonen kotransportiert (Benning, 1986; Lomax *et al.*, 1995). Molekulare Hinweise auf die Existenz eines Auxin-Carriers gab die Charakterisierung des *AUX1*-Gens von *A. thaliana* (Bennett *et al.*, 1996). Das vom Gen kodierte Membranprotein besitzt Homologien zu Aminosäuren-Permeasen, und der Phänotyp der *aux1*-Mutante weist einen Defekt im Wurzelgravitropismus auf.

Auxinwirkung

Bei der Analyse von Auxinwirkungen kann zwischen den primären molekularen Reaktionen und den sich daraus entwickelnden Langzeiteffekten unterschieden werden. Da nur die primären Auxinantworten Hinweise auf molekulare Komponenten der Signaltransduktionswege geben können, wird im folgenden ausschließlich auf die Untersuchungen zu Auxinwirkungen eingegangen, die sich innerhalb von Sekunden (Änderung des Transmembranpotentials) bis Stunden (Zellstreckungswachstum) ereignen.

Zu einer der physiologisch am besten untersuchten Auxinwirkungen gehört das Streckungswachstum der Graskoleoptile (Bonner, 1933). Im Streckungsexperiment steigt nach der Zugabe von Auxin die Wachstumsrate nach einer Verzögerung von etwa 10 Minuten an (Übersicht s. Davies, 1995). Nach der *Acid Growth Theory* führt ein vermehrter Ausstrom von Protonen zu einer Absenkung des pH-Wertes im Apoplasten (Übersicht s. Kutschera, 1994). Diese Ansäuerung führt über bisher ungeklärte Mechanismen zu einer Schwächung der Zellwand (Cleland, 1995). Die gesteigerte Plastizität der Zellwand bewirkt unter dem konstant bleibenden Turgor eine Dehnung und folglich eine Streckung der Zelle. Der erhöhte Protonentransport in den Apoplasten kann durch eine Erhöhung der H⁺-ATPase-Konzentration an der Plasmamembran erklärt werden (Hager *et al.*, 1991), einhergehend mit einer Aktivitätssteigerung der H⁺-ATPase (Santoni *et al.*, 1990, Gehring *et al.*, 1990). Das Transmembranruhepotential an der Plasmamembran liegt etwa bei -120 bis -160 mV (Sze *et al.*, 1999). Eine Auxin-induzierte Erhöhung des Protonentransports führt demnach zu einer Hyperpolarisation. Allerdings vermögen ebenfalls inaktive Auxinanaloga diese Hyperpolarisation hervorzurufen (Felle *et al.*, 1991). Folglich ist die Aktivierung der H⁺-ATPase allein nicht ausreichend für Auxin-induziertes Wachstum.

Schließzellen werden in der Analyse von Signaltransduktionswegen eingesetzt, da sie sowohl zahlreiche exogene Signale wahrnehmen (z. B. Licht, Feuchtigkeit, Kohlendioxid) als auch auf Pflanzenhormone reagieren (Übersicht s. Assmann, 1993). Das Öffnen der Stomata beruht auf der Erhöhung des Turgors in den Schließzellen. Dieser wird durch die Aufnahme und Erzeugung bzw. Abgabe von osmotisch wirksamen Substanzen reguliert. Während der Öffnung der Stomata kommt es zu einem Ausstrom von Protonen, zur Aufnahme von Kalium- und Chlorid-Ionen sowie zu einer Synthese von Malat (Übersicht s. Assmann, 1993). Auxin besitzt einen bimodalen Einfluß auf die Schließzellbewegung: Eine maximale Öffnung der Spaltöffnungen von *Vicia faba* wird durch 5 µM 1-NAA erreicht, während höhere Konzentrationen (500 µM) dagegen zu einem Schließen führen (Marten *et al.*, 1991, Assmann, 1993). Eine molekulare Erklärung könnte die Aktivität der spannungsabhängigen Kaliumkanäle sein. Niedrige Auxinkonzentrationen (0,1 bis 10 µM) stimulieren den Einstrom, während Konzentrationen über 30 µM den Einstrom hemmen (Blatt und Thiel, 1994). Die Aktivierung des einwärts gerichteten Kaliumionenstroms ist vermutlich für die häufig beobachtete anfängliche Depolarisierung des Transmembranpotentials verantwortlich (Bates und Goldsmith, 1983; Felle *et al.*, 1991; Blatt und Thiel, 1994). Dagegen nimmt die

Leitfähigkeit des auswärtsgerichteten Kaliumkanals mit steigender Auxinkonzentration (>10 μM) stetig zu (Blatt und Thiel, 1994).

Ferner induziert Auxin die Transkription von sogenannten frühen *auxin-response*-Genen, deren Genprodukte möglicherweise eine Funktion bei Streßanpassung, interzellulärer Kommunikation und Regulierung von Genexpression besitzen (Übersicht s. Abel und Theologis, 1996). Die Untersuchung dieser schnell induzierbaren Gene führte zu einer Vielzahl unterschiedlicher Genfamilien, wie z. B. der *GH3*-, *SAUR*- (*small upregulated RNA*) und *AUX/IAA*-Gene. Die Funktion der entsprechenden Genprodukte ist bisher unbekannt, mit Ausnahme erster Hinweise auf eine Bedeutung der *AUX/IAA*-Genfamilie. Mit ARF1 (*auxin-response factor 1*) wurde ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der an konservierte Promotorelemente bindet, die für die Auxin-regulierte Genexpression verantwortlich sind (Ulmasov *et al.*, 1997a). Es wurde gezeigt, daß ARF1 mit ARF1-ähnlichen Proteinen und mit Mitgliedern der *AUX/IAA*-Proteinfamilie dimerisieren kann und daß diese Interaktion möglicherweise zu einer Inaktivierung von ARF1 führt (Kim *et al.*, 1997; Ulmasov *et al.*, 1997b). Die Regulierung der Aktivität, Stabilität bzw. des Abbaus von *AUX/IAA*-Proteinen könnte daher einen bedeutenden Steuerungsmechanismus der Auxin-induzierten Genexpression darstellen. Daß Proteindegradation in der Signaltransduktion von Auxin tatsächlich eine Rolle spielen könnte, zeigt die Charakterisierung dreier Proteine. Die bereits seit einigen Jahren bekannte *A. thaliana*-Mutante *AXR1* wurde in einem Auxinresistenz-*Screen* entdeckt. (Leyser *et al.*, 1993). Das *AXR1*-Protein besitzt eine große Ähnlichkeit zum Aminoterminus von Ubiquitin-aktivierenden Enzymen (E1-Enzymen), die den ersten Schritt in der Übertragung des Ubiquitinrestes auf das abzubauen Zielprotein katalysieren. Ergänzend dazu wurde ein zweites Gen (*ECR1*) isoliert, dessen Genprodukt eine große Ähnlichkeit zum Carboxyterminus von E1-Enzymen einschließlich eines möglicherweise katalytisch wirksamen Cysteinrestes aufweist (del Pozo *et al.*, 1998). Zusammen mit *AXR1* aktiviert *ECR1* ein konserviertes Ubiquitin-verwandtes Protein (*RUB1*) durch Ausbildung einer Thioesterbindung (del Pozo *et al.*, 1998). Das dritte Protein, *TIR1*, wurde wie *AXR1* in einem Auxinresistenz-*Screen* entdeckt und weist eine große Ähnlichkeit zu möglichen Komponenten des Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplexes (E3) auf (Ruegger *et al.*, 1997). Diese Proteinkomplexe katalysieren im letzten Schritt der Ubiquitin-Kaskade die Übertragung des Ubiquitinmoleküls auf das Zielprotein (Hochstrasser, 1996).

Trotz der Aufklärung einiger molekularer Wirkmechanismen von Auxin in den letzten Jahren wie z. B. die o. g. rasche Induktion von Genexpression oder die mögliche Beteiligung eines Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs, ist über die Auxinperzeption nur wenig bekannt.

1.2 Auxin-bindende Proteine

Isolierung und biochemische Charakterisierung

Die ersten Versuche zur Identifizierung eines möglichen Auxinrezeptors begannen mit Auxinbindungsstudien an Extrakten von Maiskoleoptilen (Hertel *et al.*, 1972). Es konnte gezeigt werden, daß radioaktiv markierte Auxine spezifisch an Membranfraktionen binden. Mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Auxin-bindende Fraktion dem rauhen ER zugewiesen (Ray, 1977). Später entdeckte man neben dem ER zwei weitere membranständige Auxinbindestellen am Tonoplasten und an der Plasmamembran (Dohrmann *et al.*, 1978). Schließlich gelang mittels Affinitätschromatographie mit Hilfe von immobilisierter 1-Naphthylessigsäure (1-NAA) die Isolierung eines Proteins aus der mikrosomalen Proteinfraction von Maiskoleoptilen mit einer apparenten molekularen Masse von 22 kDa (Shimomura *et al.*, 1986). Unter nativen Bedingungen liegt dieses Auxin-bindende Protein (ABP) als Homodimer, jedoch nach SDS-Denaturierung (nichtreduzierend) als Monomer vor (Shimomura *et al.*, 1986). Antikörper gegen das ABP bzw. spezifische Oligonukleotide wurden genutzt, um Expressionsbibliotheken zu analysieren und um schließlich die cDNA zu klonieren (Tillmann *et al.*, 1989; Hesse *et al.*, 1989; Inohara *et al.*, 1989). Sowohl weitere biochemische als auch molekularbiologische Analysen der aus der cDNA abgeleiteten Primärsequenz ergaben folgende Charakteristika (Hesse *et al.*, 1989): Das offene Leseraster kodiert für ein Protein aus 201 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 21990 Da. Das Protein besitzt eine N-terminale ER-Signalsequenz und die vier C-terminalen Aminosäuren KDEL, die für die Retention von Proteinen im ER verantwortlich sind (Pelham, 1988). Ferner konnte eine Glykanrest nachgewiesen werden, der aufgrund der ermittelten Stöchiometrie von Mannose und Glukosamin wahrscheinlich vom mannosereichen Typ ist.

Mit Hilfe der cDNA-Sequenz von *ZmERabp1* war es möglich, weitere Mitglieder der ABP-Familie in Mais und anderen Pflanzenspezies zu identifizieren, z. B. in Erdbeere (Lazarus und

Macdonald, 1996), Tabak (Leblanc *et al.*,1997) und in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Palme *et al.*, 1992). Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Abb. 2) liefert die folgenden Charakteristika (Abb. 1). Allen homologen Proteinen gemeinsam sind die Signalsequenz und das ER-Retentionssignal, sowie eine hochkonservierte Sequenz (Box A). ABP aus dikotyledonen Pflanzen besitzen im Unterschied zu den Homologen aus monokotyledonen Pflanzen zwei theoretische Glykosylierungsstellen (FrERabp1 aus Erdbeere besitzt 3 theoretische Glykosylierungsstellen). Für NtERabp1 konnte gezeigt werden, daß diese Stellen tatsächlich glykosyliert sind (Watanabe und Shimomura, 1998).

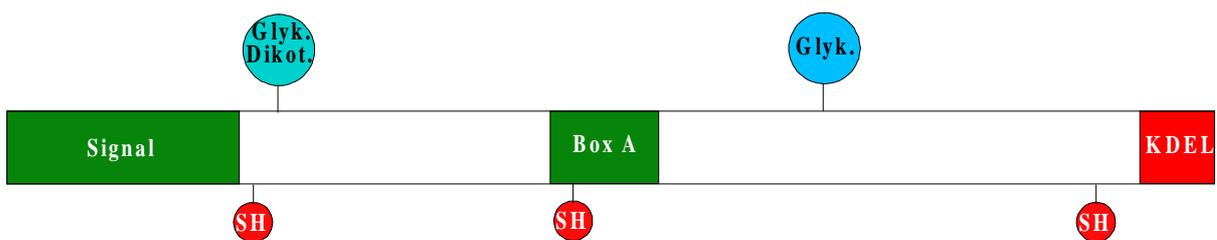


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Auxin-bindenden Proteins. Die ER-Signalsequenz sowie die konservierte Box A sind grün, das ER-Retentionssignal KDEL ist rot unterlegt. Ferner sind die ungefähren Positionen der drei konservierten Cysteinreste (SH) und die Glykosylierungsstellen markiert.

Funktionelle Untersuchungen

Die ersten funktionellen Analysen wurden durch Messung des Transmembranpotentials von Tabakprotoplasten durchgeführt. Die Zugabe von Auxin zu Tabakprotoplasten führte zu einer Hyperpolarisation des Transmembranpotentials, die nach zwei Minuten abgeschlossen war (Ephritikhine *et al.*, 1987). Präinkubation der Protoplasten mit Antikörpern gegen ZmERabp1 hemmte diese Auxin-spezifische Reaktion (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989). Das Ergebnis impliziert zum einen die Notwendigkeit eines funktionell aktiven ABP, um diese Hyperpolarisationsantwort auszulösen; zum anderen muß sich das funktionell aktive Protein an der Außenseite der Plasmamembran befinden, da die Antikörper nicht ins Zellinnere gelangen können. Ein weiterer Hinweis für die Membranständigkeit lieferten Experimente mit membranundurchlässigen Auxinanaloga (Venis *et al.*, 1990). Diese waren in der Lage, an Tabakprotoplasten die Auxin-spezifische Hyperpolarisation auszulösen.

Diese Ergebnisse und auch weitere Untersuchungen stehen im Widerspruch zu den biochemischen Charakteristika des Proteins. ZmERabp1, wie alle homologen Proteine, weist keine Transmembrandomäne auf und wird effizient im ER zurückgehalten (Hesse *et al.*, 1989; Henderson *et al.*, 1997). Aus diesen Gründen wurde die Theorie eines mit ABP interagierenden Membranproteins, eines sogenannten *docking proteins* aufgestellt (Klämbt, 1990). Nach Interaktion beider Proteine im ER soll der postulierte Auxinrezeptor zur Plasmamembran transportiert werden. Jedoch wurde die Existenz eines solchen Proteins nie bewiesen.

Weitere Untersuchungen mit Antikörpern gegen Epitope von ZmERabp1 führten zu einer interessanten Entdeckung: Ein anti-ZmERabp1-Peptidantikörper, der gegen eine in allen Auxin-bindenden Proteinen hochkonservierte Region (Box A) gerichtet ist, induzierte eine Auxin-ähnliche Hyperpolarisation in Tabak-Protoplasten (Venis *et al.*, 1992). Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, daß dieses Peptid eine Rolle in der Bindung von Auxin spielt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Antikörper allosterisch an das Protein bindet und die Auxinwirkung durch eine indirekte Konformationsänderung induziert wird. Um die Auxinbindestelle direkt zu identifizieren, wurde die Technik der Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode können Liganden über die licht-sensitive Azido-Gruppe kovalent an ihr Rezeptorprotein gebunden werden. In diesem Fall wurde mit Tritium radioaktiv markierte Azido-IAA verwendet (Brown und Jones, 1994).

Nach Bindung, Photolyse und tryptischem Verdau wurde die Radioaktivität spezifisch einem Peptid zugeordnet. Das markierte Peptid liegt in der C-terminalen Region von ZmERabp1, könnte aber im nativen Protein zusammen mit der Box A die Bindetasche für Auxin bilden. Es wird postuliert, daß das konservierte Tryptophan¹³⁶ den hydrophoben Indolring von IAA bindet, während die positiv geladene Histidin-Arginin-Histidin-Sequenz aus der Box A die Carboxylgruppe bindet (Brown und Jones, 1994).

Nachdem eine Beteiligung von Auxin-bindenden Proteinen an der Signaltransduktion von Auxin sehr wahrscheinlich erschien, suchte man nach einem Mechanismus, der Hinweise auf die Beteiligung weiterer Elemente der Auxinsignalkaskade geben könnte. Peptide, die aufgrund ihrer Hydrophilie mögliche Epitope von ZmERabp1 darstellen, wurden auf ihre Aktivität in Schließzellen von *Vicia faba* untersucht (Thiel *et al.*, 1993). Ein Dodecapeptid des C-Terminus von ZmERabp1 inaktivierte einwärts gerichtete Kaliumkanäle und aktivierte auswärts gerichtete Kaliumkanäle. Parallel dazu wurde eine Alkalinisierung des Cytoplasmas beobachtet, die den eigentlichen Stimulus für die Änderung der Ionenpermeabilität darstellte. Die Peptid-induzierten Änderungen der Aktivitäten der Kaliumkanäle waren mit denen vergleichbar, die durch hohe Auxinkonzentrationen (30-100 µM) hervorgerufen werden (Blatt und Thiel, 1994). In Untersuchungen von Schließzellen der Orchidee *Paphiopedilum tonsum* induzierte dasselbe Peptid eine Alkalinisierung des cytoplasmatischen pH-Werts und das Schließen der Spaltöffnungen (Gehring *et al.*, 1998). Die Auxin-ähnliche Wirkung des C-Terminus von NtERabp1 wurde durch Messungen des Transmembranpotentials im Tabak-Protoplasten-System bestätigt (Leblanc *et al.*, 1999a).

Molekulargenetische Untersuchungen

Seit der Klonierung der *ABP*-cDNA aus verschiedenen Spezies ist es möglich, gezielt transgene Pflanzen herzustellen bzw. Mutanten zu isolieren, um molekulargenetisch die Bedeutung des jeweiligen Gens zu analysieren. In einer Maiszelllinie wurde die *ZmERabp1*-cDNA unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven 35S-Promotors exprimiert (Jones *et al.*, 1998). Im Vergleich zu einer Kontrollzelllinie waren die Zellen, die *ZmERabp1* überexprimierten, deutlich größer. Des weiteren wurde *AtERabp1* unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren Promotors exprimiert. Die Induktion führte nach Auxinapplikation zu einem verstärktem Zellstreckungswachstum in Tabakblättern (Jones *et al.*, 1998). Auffallend

ist jedoch, daß die Erhöhung der Menge des postulierten Auxinrezeptors in Tabakpflanzen erst nach exogener Auxinzugabe zu einem Phänotyp führte.

Ferner gelang die Isolierung einer heterozygoten Mutante von *A. thaliana*, die eine *T-DNA*-Insertion im *AtERabp1*-Gen trägt. Die nach Selbstung entstandenen homozygoten Embryonen waren in einem frühen Stadium letal. Dies weist auf eine bedeutende Rolle des Proteins bei der Embryonalentwicklung hin (Chen *et al.*, 2000).

1.3 Zielsetzung

Trotz zahlreicher Hinweise auf eine Bedeutung von Auxin-bindenden Proteinen an der Auxin-signaltransduktion ist es bisher nicht gelungen, die Funktion dieser Proteine direkt nachzuweisen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Proteine AtERabp1 und ZmERabp1 umfassend zu charakterisieren.

Zuerst sollte die gewebespezifische Transkription des *AtERabp1*-Gens untersucht werden. Ferner sollten spezifische anti-AtERabp1-Peptidantikörper hergestellt werden, die sowohl die Verifizierung der Transkriptanalyse als auch die zelluläre Lokalisierung des Proteins erlauben.

Zu Beginn dieser Arbeit standen transgene Pflanzen von *A. thaliana* zur Verfügung, die die *AtERabp1*-cDNA in *sense*- und *antisense*-Orientierung unter der Kontrolle eines aktivierbaren Promotors trugen. Zur Funktionsanalyse sollten die transgenen Pflanzen aktiviert und die daraus resultierenden *AtERabp1-sense*- und *antisense*-Pflanzen untersucht werden.

Bisher gibt es noch keine Daten zur Lage einer möglichen Disulfidbrücke in ABP. ZmERabp1, das einzige Auxin-bindende Protein, das in ausreichenden Mengen nativ aus Pflanzen isoliert werden kann, sollte daher massenspektrometrisch analysiert werden.

Ferner sollte AtERabp1 in *E. coli* rekombinant exprimiert und danach renaturiert werden. Damit sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, AtERabp1 umfassend *in vitro* zu analysieren.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten spezifischen Antikörper sowie synthetischer Peptide sollte eine neue Methode zur funktionellen Analyse der Auxinantwort in Maisprotoplasten entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Kikkoman (Tokyo, Japan), *Merck* (Darmstadt), *New England Biolabs* (Schwalbach), *Roche Diagnostics* (Mannheim), *USB* (Cleveland, USA), *Yakkult Honsha* (Tokyo, Japan).

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich Chemie (Steinheim), *Amersham Pharmacia Biotech* (Uppsala, Schweden), *J.T. Baker*, (Griesheim), *BDH Biochemicals Ltd.* (Poole, Großbritannien), *Bethesda Research Laboratories* (Neu-Isenburg), *Biomol* (Hamburg), *Bio-Rad Laboratories* (München), *Calbiochem* (Frankfurt) *Difco Laboratories* (Detroit, USA); *Duchefa* (Haarlem, Niederlande), *Fluka* (Neu-Ulm) *Gibco BRL* (Karlsruhe), *Merck* (Darmstadt), *New England Biolabs* (Schwalbach), *Novabiochem* (Bad Soden), *Pierce Chemical Company* (Rockford, USA), *Roche Diagnostics* (Mannheim), *Roth* (Karlsruhe), *Serva* (Heidelberg), *Sigma* (München).

2.1.3 Bakterienstämme

- DH5 α : F⁻, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (*r_k⁻-m_k⁺*), *deoR*, *thi-1*, *supE44*, λ -, *gyrA96*, *relA1*
- DH10B: F⁻, *mrcA*, D(*mrr.hsdRMS-mcrBC*), F80dlacZDM15, DlacX74, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, D(*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, 1-, *rpsL*, *nupG*.
- BL21: F⁻, *ompT*, *dcm*, *hsdS*, (*r_B⁻-m_B⁻*)

2.1.4 Vektoren

- pET28a: Amp^R (*Novagen*, Madison, USA)
- pUC18: Amp^R (Vieira und Messing, 1982)

2.1.5 Geräte

Peptid-Synthesizer EPS 221	<i>Abimed, Langenfeld</i>
Ultrafiltrationszelle, Ultrafiltrationsmembranen	<i>Amicon Corporation, Danvers, USA</i>
Spektralphotometer DU-40 System Gold HPLC Szintillationszähler LS7500	<i>Beckman Instruments, München</i>
TRIO-Thermoblock	<i>Biometra, Göttingen</i>
Elektroporator	<i>Bio-Rad, München</i>
GT-1212B Digitalisiertablett	<i>Genius, Cambridge, Großbritannien</i>
Hybridisierungsöfen HERAhybrid 6	<i>Heraeus, Düsseldorf</i>
Durst M301	<i>Jobo Fototechnic, Ann Arbor, USA</i>
Mikroskop, DMRB Microtom RM2065	<i>Leica, Wetzlar</i>
Phosphorimager Storm 860	<i>Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA</i>
SFM 25 Fluoreszenzspektrometer	<i>Kontron AG, Zürich, Schweiz</i>
GeneAmp™ PCR System 9600 Fluorimeter LS-2B ABI Prism™ 377	<i>Perkin Elmer, Weiterstadt</i>
Stratalinker UV Crosslinker 1800	<i>Stratgene, La Jolla, USA</i>
ThermoQuest LCQ Classic	<i>ThermoQuest, San Jose, USA</i>

2.1.6 Datenverarbeitung

DNASTAR	<i>Lasergene, Madison, USA</i>
GPMAW 3.13	<i>Lighthouse data, Raleigh, USA</i>
Integrationsprogramm	H. Lüthen, Universität Hamburg, 1998
BioMultiView 1.1.1.	<i>Perkin Elmer, Weiterstadt</i>
Sigma Plot 4.0	<i>SPSS, Chicago, USA</i>

Navigator 1.1

Thermo Quest, San Jose, USA

2.1.7 Kulturmedien

2.1.7.1 Bakterienmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 l bidest. H₂O gelöst, für Festmedien wurden 15 g Agar zugefügt, alle Medien wurden 20 Minuten autoklaviert.

LB: 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 pH 7,5

TY-Medium: 16 g Trypton
 10 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 pH 7,5

Je nach Resistenzgen in den verwendeten Vektoren wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin hinzugefügt.

2.1.7.2 Pflanzenmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 l bidest. H₂O gelöst.

ARA Festmedium: 2,15 g Murashige und Skoog Basal-salt-mixture (*Sigma*)
 0,1 g myo-Inositol
 0,5 g MES
 10 g Saccharose
 8 g Agar-Agar
 pH 5,7 mit KOH; 20 Minuten autoklavieren

Je nach Resistenz der ausgelegten Samen wurden nach dem Autoklavieren 15 µg/ml Hygromycin bzw. 50 µg/ml Metothrexat hinzugefügt.

ARA Flüssigmedium: 4,3 g Murashige und Skoog Basal-salt-mixture (*Sigma*)
 0,1 g myo-Inositol
 0,5 g MES
 30 g Saccharose
 pH 5,7 mit KOH; 20 Minuten autoklavieren

2.1.8 Pflanzen

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia

Zea mays (L.) cv Hybridsaatmais Mutin

Zea mays (L.) cv Garant

2.2 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1 DNA-Präparationen

Wenn nicht anders angegeben, wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen gearbeitet. Zentrifugiert wurde in einer Tischzentrifuge von Eppendorf (Typ 5417C) bei einer Höchstgeschwindigkeit von 14000 rpm und RT.

2.2.1.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte in einer modifizierten Form nach Holmes und Quigley (1981). Von einer Bakterienkultur (LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika) wurden 1,5 ml 1 Minuten zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 200 µl STEL-Puffer resuspendiert, 45 Sekunden bei 95 °C erhitzt, 15 Minuten zentrifugiert und der weiße Niederschlag mit einem Zahnstocher entfernt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt und 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Nukleinsäuren mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem kurzem Trocknen des Niederschlags wurde er in 50 µl Wasser gelöst.

STEL-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 8 % (w/v) Saccharose; 5 % (v/v) Triton X-100; 50 mM EDTA; 0,5 mg/ml Lysozym frisch zugegeben

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über Qiagen-Säulen

Größere und reinere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Mini- bzw. Midi-Qiagen-Kits nach den Angaben des Herstellers (*Qiagen*) isoliert.

2.2.2 Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden alle benötigten Lösungen und Geräte 2 x 30 Minuten autoklaviert, 8 Stunden bei 180 °C gebacken, eine Stunde in 1 M Natronlauge inkubiert oder mit 0,1 % (v/v) DEPC behandelt (Inkubation mit DEPC entweder eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei RT, anschließend autoklaviert).

300 mg Blätter oder Hypokotylregionen von vier Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen, Spößachsen und Blüten von sechs Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen sowie Wurzeln von vier

Wochen alten *A. thaliana* Wurzelkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in 1 ml Puffer A resuspendiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei RT und 14000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Isolierung der Poly(A)⁺-RNA aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe magnetischer oligo(dT)₂₅-Dynabeads. Zunächst wurde der Überstand mit 1,5 mg Beads (resuspendiert in 150 µl Puffer A) für 5 Minuten bei RT inkubiert. Zur Sedimentation der Beads wurden die Eppendorfgefäße eine Minute in den Magnethalter gestellt, der Überstand abgenommen und für eine zweite Extraktion auf Eis gelagert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit je 500 µl Puffer B wurde die RNA anschließend mit 50 µl Puffer C bei 65 °C eluiert. Nach der zweiten Extraktion wurden die Eluate vereinigt und einer dritten Extraktion unterzogen. Die letzte Elution erfolgte in 30 µl Puffer C.

Puffer A: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM LiCl; 2 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS; 5 mM DTT
Puffer B: 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM LiCl; 1 mM EDTA; 0,2 % (w/v) SDS
Puffer C: 2 mM EDTA pH 8,0

2.2.3 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der OD₂₆₀ bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ 1,0 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden 20 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.4 Enzymatische Reaktionen mit DNA

2.2.4.1 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA erfolgte in den vom Hersteller gelieferten Puffern bei der für das jeweilige Enzym entsprechenden Temperatur. Das Volumen der eingesetzten Nukleasen durfte wegen ihres Glyceringehaltes 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Bei Restriktionsanalysen der aus Schnellpräparation gewonnenen DNA wurden 3 µl DNA mit 5 U Restriktionsenzym und 100 µg/ml RNase A 45 Minuten inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für Klonierungsansätze wurden 5 µg DNA mit 4 U Restriktionsenzym 2-3 Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Durch Behandeln linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase (Shrimps Alkaline Phosphatase, SAP) wurden selektiv die Phosphatgruppen am 5'-Ende abgespalten. Bei Klonierungen wurde somit eine Religation des Vektors verhindert. Zur Dephosphorylierung der Restriktion wurden 0,2 U SAP/µg DNA zum Ansatz pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.3 Auffüllreaktionen einzelsträngiger DNA-5'-Enden

Mit dieser Methode wurden durch T4-DNA-Polymerase 5'-Überhänge in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden aufgefüllt bzw. 3'-Überhänge abgebaut. Dazu wurde nach Beendigung der Restriktion T4-DNA-Polymerase und Enzympuffer, sowie BSA, dNTPs (je 0,25 mM) hinzugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Falle kohäsiver Enden wurde das zu klonierende Fragment in 2-5fachem Überschuß, im Falle glatter Enden in mindestens 10fachem Überschuß zum Vektor eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug bei kohäsiven Enden 2 Stunden bei RT, bei glatten Enden 4 Stunden bei RT.

2.2.4.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977). Durchgeführt wurden die Sequenzierungen von der ADIS Gruppe des MPI mit dem ABI Prism 377-Sequenzierautomat nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988)

DNA-Amplifikationen mittels PCR wurden in einem TRIO-Thermoblock von *Biometra* durchgeführt.

PCR Ansatz:

2 µl	(10 ng)	DNA
10 µl		10 x Taq Puffer
8 µl		dNTPs (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
je 1 µl		25 pmol/µl Primer
1 µl		2,5 U/µl Taq Polymerase (<i>Roche Diagnostics</i> , Mannheim)
77 µl		H ₂ O

PCR-Bedingungen:

<u>2 Minuten</u>	94 °C	}	30 x
30 Sekunden	94 °C		
30 Sekunden	45-60 °C		
<u>3 Minuten</u>	72 °C	}	
5 Minuten	72 °C		

10 x Taq-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 0,1 % Gelatine

Die Reinigung des PCR-Produkts erfolgte durch Agarosegelelektrophorese gefolgt von einer Gelelution des amplifizierten Fragments. Zur Auswahl der geeigneten Primer wurde ein Computerprogramm (*DNASTAR*) verwendet.

2.2.5 Gelelektrophoretische Methoden

2.2.5.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mittels Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht und die Lösung in einen Gelträger mit Kamm als Taschenformer gegossen. Das Gel wurde auf dem Gelträger in die mit TBE-Puffer gefüllte horizontale Gelkammer gelegt und die Proben eingefüllt, die mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt waren. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Standard, z. B. PstI geschnittene Lambda-DNA, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 35, 60 oder 120 V. Nach der Auftrennung konnte die Position der DNA-Fragmente durch Fluoreszenz des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

TBE-Puffer: 90 mM Tris 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; 0,2 $\mu\text{g/ml}$; Ethidiumbromid; pH 8,0
 Probenpuffer: 15 % (v/v) Ficoll 400; 75 mM EDTA; 0,25 % Bromphenolblau; pH 8,0

2.2.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe von Gel Extraction Kit (*Qiagen*, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6 Northern-Blot

2.2.6.1 Trennung und Transfer von RNA

RNA wird unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 60 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte bei 2 V/cm Gel. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen siehe 2.2.2. RNA liegt in Formaldehyd-Agarosegelen bereits denaturiert vor. Das Gel wurde lediglich 10 Minuten in 20 x SSC inkubiert. Der Transfer der RNA auf eine Hybond-N Nylonmembran (*Amersham Buchler*) erfolgte als Kapillarblot mit 20 x SSC über Nacht. Nach dem Transfer wurde die RNA mit UV-Licht (UV Crosslinker, *Stratagene*) über kovalente Bindungen auf der Membran fixiert.

RNA-Agarosegel: 1,2 g Agarose
 72 ml H₂O
 10 ml 10 x MOPS pH 8,0
 Aufkochen, bis auf 50 °C abkühlen lassen, dann Zugabe von 18 ml 37 % Formaldehyd

10 x MOPS: 200 mM MOPS; 80 mM NaAc; 10 mM EDTA; pH 8,0 für Gele, pH 7,0 für Laufpuffer

2 x Probenpuffer: 660 µl Formamid
 80 µl 37 % Formaldehyd
 10 µl 10 % Bromphenolblau
 100 µl 10 x MOPS pH 7,0
 150 µl H₂O

20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

2.2.6.2 Radioaktive Markierung von DNA

Radioaktive DNA-Sonden wurden mit dem „rediprime DNA labelling system“ (*Amersham Pharmacia Biotech*) hergestellt. Die DNA (2,5-25 ng) wurde auf ein Volumen von 45 µl verdünnt, zur Denaturierung 3 Minuten auf 95 °C erhitzt, auf Eis schockgekühlt und zum Reaktionsansatz gegeben. Ferner wurden 5 µl α³²P-dCTP (50 µCi) hinzugefügt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trennung markierter DNA von den freien Nukleotiden wurde mit dem „PCR Purification Kit“ (*Roche Diagnostics*) nach Angaben des Herstellers vorgenommen und die DNA in 200 µl Wasser eluiert. Zur Analyse der Sonde wurde die Radioaktivität einer 2 µl Probe mit einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.6.3 Nachweis der filtergebundenen RNA

Die folgenden Reaktionsschritte wurden in einer Glasröhre (Typ GL 45, *Amersham International*) im Hybridisierungsöfen HERAhybrid 6 (*Heraeus*) vorgenommen. Um unspezifischen Bindungsstellen der Nylonmembran abzusättigen, wurde die Membran mindestens 2 Stunden bei 42 °C in 10 ml Hybridisierungslösung prähybridisiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und die radioaktive Sonde in Hybridisierungslösung in einer Konzentration von 2 x 10⁶ cpm/ml zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Danach wurde die Membran zweimal 15 Minuten mit 2 x SSC; 0,1 % SDS bei 42 °C und 10 Minuten mit 2 x SSC; 0,1 % SDS bei 55 °C von unspezifisch gebundener DNA-Sonde befreit. Die Detektion der Signale wurde mit einer Verstärkerschicht (Phosphor Screen GP, SO-230, *Kodak*) in einer Filmkassette über einen Zeitraum von 1-2 Tagen vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphorimager.

Hybridisierungslösung: 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,0; 5 mM EDTA; 0,9 M NaCl; 1 x Denhardt's; 1 % (w/v) SDS; 250 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA, 50 % (v/v) Formamid
 100 x Denhardt's: 10 g Ficoll 400; 10 g PVPP; 10 g BSA; 500 ml H₂O; sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert

2.2.7 Bakterientransformation

2.2.7.1 Präparation elektrokompeter *E. coli*-Zellen

Mit 5 ml einer *E. coli* DH5α Übernachtskultur (LB-Medium) wurden 500 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf 4 °C abgekühlt und 15 Minuten bei 6000 rpm (GSA-Rotor) und 4 °C zentrifugiert.

Um die Bakterien von Medium und Salzen zu befreien, wurden die Bakterien dreimal zentrifugiert und wie folgt resuspendiert: 1) 500 ml H₂O, 2) 250 ml H₂O, 3) 15,5 ml 10 % v/v Glycerin. Alle Lösungen wurden vorher auf 4 °C gekühlt. Schließlich wurden die Bakterien in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin in Wasser aufgenommen, zu jeweils 30 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.7.2 Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (*Bio-Rad*) gegeben. Der Elektroporator wurde auf eine Kapazität von 25 µF und auf einen Widerstand von 200 Ω eingestellt. Die Transformation erfolgte mit einem Spannungspuls von 2,5 kV mit einer Halbwertszeit von 4-4,7 ms. Danach wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium resuspendiert und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausstreichen von Aliquots auf Festmedium mit entsprechenden Antibiotika.

2.3 Methoden zur Proteinanalyse

2.3.1 Präparation pflanzlicher Proteine aus *A. thaliana*

2.3.1.1 Proteinpräparation für SDS-PAGE

Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml Puffer A suspendiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (4 °C) wurde der Überstand abgenommen und die Mikrosomen bei 100000g sedimentiert (1h, 4 °C). Der Überstand wurde als lösliche Fraktion bezeichnet und vor der Elektrophorese in der Regel einer TCA-Fällung unterzogen. Die mikrosomalen Proteine wurden in Puffer B mit Hilfe eines Glasstabes extrahiert und bei -20 °C gelagert.

Puffer A: 100 mM Tris/Citronensäure, pH 8,0; 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂; 3,5 mg/l Trasylol, 100 µg/l Leupeptin

Puffer B: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,8; 0,5 M NaCl; 2 M Harnstoff

2.3.2 Methoden zur Konzentrationsbestimmung

2.3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bichinonsäure (Smith *et al.*, 1985)

Für Proteinbestimmungen nach der Bichinonsäure-Methode wurde das BCA Protein Assay Reagent (*Pierce*) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.2.2 Bestimmung der Thiolgruppenkonzentration (Ellmans-Test) (Riddles *et al.*, 1979)

Diese Methode dient der quantitativen Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen. Zu je 20 µl Probenlösung wurden 20 µl Ellmans Reagenz und 1 ml PBS pipettiert und gemischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurde die OD₄₁₂ gemessen. Anhand der mit Cystein erstellten Standardgeraden ließ sich anschließend die Konzentration der freien Thiolgruppen ermitteln.

Ellmans Reagenz: 4 mg Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbonsäure in 1 ml PBS
 PBS: 7 mM Na₂HPO₄/1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl

2.3.3 TCA-Fällung (Bensadoun & Weinstein, 1976)

Zur Konzentrierung von Proteinen aus verdünnten Lösungen wurden diese mit Trichloressigsäure zu einer Konzentration von 7 % (w/v) versetzt. Die Fällung erfolgte 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Proteine zentrifugiert, der Niederschlag mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in Puffer aufgenommen.

Puffer: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,8; 0,5 M NaCl; 2 M Harnstoff

2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde unter denaturierenden Bedingungen (0,1 % (w/v) SDS) in Gegenwart von 0,8 % (v/v) Mercaptoethanol durchgeführt. Das verwendete diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli (1970) bestand aus einem Sammelgel (pH 6,8) mit einer Acrylamidkonzentration von 4 % (v/v) und einem Trenngel (pH 8,8) mit 12 % (v/v) Acrylamid. Zur Herstellung des Trenngels wurden alle Komponenten vor der Zugabe von TEMED und APS gemischt und entgast. Die Lösung wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet, in die sofort ein Kamm zur Ausbildung der Probenfächer gesteckt wurde. Die Proteinlösung, die 30 bis 100 µg Protein enthielt, wurde mit ¼ Volumen 5 x Probenpuffer versetzt und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei RT in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur mit einer Stromstärke von zunächst 10 mA. Nachdem die Lauffront, markiert durch Bromphenolblau, das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht.

Sammelgel: 0,125 M Tris/HCl pH 6,8; 3,75 % (v/v) Acrylamid; 0,11 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,2 % (v/v) TEMED; 0,04 % (w/v) APS
 Trenngel: 0,375 M Tris/HCl pH 8,8; 12 % (v/v) Acrylamid; 0,23 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 5 % (v/v) Glycerin; 5 % (w/v) SDS; 0,3 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) APS
 Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris pH 8,3; 0,2 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
 5 x Probenpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 40 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder einer Coomassie- bzw. Silberfärbung unterzogen oder zur Immundetektion (Western-Blot) der Proteine verwendet.

2.3.5 Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1985)

Zur Färbung wurde das Gel 10 bis 15 Minuten in 65 °C heiße Färbelösung gelegt. Anschließend wurde der Farbstoff mit Entfärbelösung bei 65 °C solange ausgewaschen, bis der Hintergrund entfärbt war. Das Gel wurde getrocknet, indem es zwischen zwei Lagen Zellophanfolie auf einen Gel-trocknungsrahmen gespannt wurde.

Färbelösung: 7 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Methanol; 0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau G250 in Wasser
Entfärbelösung: 7 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Methanol

2.3.6 Silberfärbung

Die Proteine wurden im Polyacrylamidgel fixiert (50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure, 30 Minuten) und das Gel zunächst 15 Minuten in 5 % (v/v) Ethanol, 1 % (v/v) Essigsäure und dann dreimal je 5 Minuten in Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel eine Minute in frischer Natriumthiosulfatlösung (0,2 g/l) inkubiert, dreimal 20 Sekunden in Wasser gewaschen und 20 Minuten in Färbelösung inkubiert. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel in Entwicklerlösung gelegt und die Färbung mit 5 % (v/v) Essigsäure beendet.

Färbelösung: 2 g/l AgNO₃; 0,75 ml/l 37 % HCOH
Entwicklerlösung: 60 g/l Na₂CO₃; 0,5 ml/l 37 % HCOH; 4 mg/l Na₂S₂O₃

2.3.7 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Bei dieser Methode wurden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen. Die gebundenen Polypeptide können mit Antikörpern spezifisch detektiert werden (Towbin *et al.*, 1979).

Die PVDF-Membran (Immobilon P, *Millipore*) wurde für 10 Sekunden in Methanol getaucht und anschließend jeweils 15 Minuten mit Wasser bzw. Anodenpuffer 2 gewaschen. Das Gel wurde etwa 5 Minuten in Anodenpuffer 2 inkubiert. Die Graphitelektroden wurden mit Wasser befeuchtet und der Transferstapel wie folgt aufgebaut: Sechs analog der PVDF-Membran (Immobilon P, *Millipore*) zugeschnittene Filterpapiere (Whatman 3MM) wurden in Anodenpuffer 1 getränkt und übereinander auf die Anode gelegt. Darüber wurden 3 Lagen in Anodenpuffer 2 getränktes Filterpapier, die vorbereitete PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und 9 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier geschichtet. Auf den Stapel wurde die Kathode aufgelegt. Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 0,8 mA/cm² Membranfläche.

Anodenpuffer 1: 300 mM Tris/HCl pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4; 25 % (v/v) Methanol
 Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 9,4; 40 mM 6-Aminocaprinsäure; 20 % (v/v) Methanol

2.3.8 Immundetektion von Proteinen (modifiziert nach Blake *et al.*, 1984)

Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Dies diente einerseits dazu, den Proteintransfer zu überprüfen und ermöglichte andererseits, die Banden des Proteinstandards zu markieren. Um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran abzusättigen, wurde eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung 1:2000 bis 1:5000 in Blockpuffer zur Membran gegeben und diese 1-2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen (je 5-10 Minuten) mit PBST entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG-Rettich-Peroxidase Konjugat aus Ziege) erfolgte in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockpuffer. Nach einer Stunde wurde die Membran fünfmal je 5-10 Minuten mit PBST und einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Super Signal Substrate Kits (*Pierce*) nach den Angaben des Herstellers.

Ponceau S-Lösung: 0,2 % (v/v) Ponceau S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure
 PBS: 7 mM Na₂HPO₄/1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl
 PBST: PBS mit 0,01 % (v/v) Tween 20
 Blockpuffer: 2 % (w/v) Magermilchpulver in PBS

2.4 Massenspektrometrische Analyse von ZmERabp1

2.4.1 Isolierung von ZmERabp1 aus Maisgewebe

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Etwa 1 kg Koleoptilen und Knotengewebe von drei Tage alten etiolierten Maiskeimlingen wurden mit 2 l STC zerkleinert und anschließend mit einem Polytron-Rührstab homogenisiert. Nach Filtration des Homogenats durch ein Nylonnetz (135 µm) wurde der Rückstand mit 1 l STC reextrahiert und erneut filtriert. Unlösliche Bestandteile der vereinigten Filtrate wurden sedimentiert (6000 g; HB-Rotor, 4 °C, 30 Minuten). Anschließend wurden die Mikrosomen mit 15 mM CaCl₂ gefällt und 20 Minuten bei 10000 g sedimentiert. Die Mikrosomen wurden in 100 ml Puffer A aufgenommen und mit einem Polytron-Rührstab homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend mit 100 ml n-Butanol versetzt, 20 Minuten gerührt und zur Phasentrennung 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Die untere wässrige Phase wurde gegen Puffer B dialysiert und durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose gereinigt. Das mit ZmERabp1 angereicherte Eluat der DEAE-Säule wurde schließlich einer Affinitätschromatographie unterzogen.

STC: 100 mM Tris/Citronensäure, pH 8,0; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂;
 10 mM Ascorbinsäure; 4 mM Diethylthiocarbaminsäure; 3,5 mg/l Trasylol;
 100 µg/l Leupeptin
 Puffer A: 2 mM K₂HPO₄; pH 8,0; 0,5 mM EGTA

Ionenaustauschchromatographie

Material:	DEAE-Sepharose <i>fast flow</i>
Gelbett:	50 ml, äquilibriert in 300 ml Puffer B
Fluß:	2 ml/min
Detektor:	0,5 OD, 280 nm
Auftrag:	100-150 ml des Dialysats (100-200 mg Protein)
Waschen:	200 ml Puffer B
Elution:	1 Säulenvolumen 0,2 M NaCl in Puffer C
Puffer B:	10 mM Natriumcitrat, pH 6,5; 5 mM MgCl ₂
Puffer C:	10 mM Natriumcitrat, pH 6,0; 5 mM MgCl ₂

Affinitätschromatographie

Material:	4-Hydroxyphenyllessigsäure gekoppelt an epoxyaktivierte Sepharose 6B (<i>Pharmacia</i>)
Gelbett:	10 ml, äquilibriert in 100 ml Puffer C
Fluß:	0,5 ml/min
Detektor:	0,2 OD, 280 nm
Auftrag:	50 ml des DEAE-Eluats (75-150 mg Protein)
Waschen:	100 ml Puffer C
Elution:	1 Säulenvolumen 50 mM NH ₄ HCO ₃ pH 9,0

Das Eluat wurde schockgefroren und bei -70 °C gelagert bzw. lyophilisiert.

2.4.2 Alkylierung von ZmERabp1

(modifiziert nach Crestfield *et al.*, 1962)

Lyophilisiertes ZmERabp1 (100 µg) wurde in 0,3 ml Puffer gelöst (Proteinkonzentration $1,67 \cdot 10^{-5}$ M). Die Lösung wurde mit 4-Vinylpyridin versetzt (1000facher molarer Überschuß bezüglich drei freier Sulfhydrylgruppen). Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM NH₄HCO₃ pH 8,5. Die Proteinlösung wurde mit festem Harnstoff (Endkonzentration 8M) und 1/10 Vol. 1 M Tris/HCl pH 8,6 versetzt. Anschließend wurde mit β-Mercaptoethanol (Endkonzentration 14,3 µM) 1h bei RT reduziert und die entstandenen Sulfhydrylgruppen durch Zugabe einer äquimolaren Konzentration Iodacetamid (14,3 µM) 30 Minuten bei RT alkyliert. Iodacetamid reagiert zuerst mit den freien Cysteinseitenketten bevor der Überschuß durch β-Mercaptoethanol abgefangen wird. Dadurch werden unspezifische Alkylierungen von Seitenketten vermieden (z.B. Tyrosin). Es folgte eine Dialyse gegen 50 mM NH₄HCO₃ pH 8,5, bevor die Probe lyophilisiert und bei -20 °C gelagert wurde.

Puffer: 200 mM Triethylamin/Essigsäure, pH 10; 50 % (v/v) Isopropanol; 4 M Harnstoff

2.4.3 Tryptischer Verdau

Lyophilisiertes ZmERabp1 wurde in 50 mM NH_4HCO_3 pH 8,5 gelöst (Konzentration 50-100 $\mu\text{g/ml}$) und mit Trypsin zu einem Protein/Trypsin-Verhältnis 1:30 versetzt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.4.4 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrische Analyse von ZmERabp1 wurde mit Hilfe eines ThermoQuest LCQ Classic (*Thermo Quest*) mittels ESI durchgeführt.

2.4.4.1 Bestimmung der molekularen Masse von ZmERabp1 durch ES-MS

Lyophilisiertes ZmERabp1 (100 μg) wurde in Lösungsmittel A gelöst und die Probe direkt in das Massenspektrometer infundiert (2 $\mu\text{l/min}$). Der Lösungsmittelstrom betrug 60 $\mu\text{l/min}$ (30 % Methanol in Wasser mit 1 % Ameisensäure). Die Ionensprayspannung betrug 4,2 kV.

2.4.4.2 Analyse der tryptischen Peptide durch LC/ES-MS und MS/MS

Die lyophilisierten tryptischen Peptide wurden in Lösungsmittel A gelöst, auf einer BDS-Hypersil Reversed Phase C18 HPLC-Säule (100 x 2.1 mm) getrennt und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 50 % (v/v) Lösungsmittel B in A innerhalb 60 Minuten bei einem Fluß von 0,3 ml/min eluiert. Die Peptide wurden mittels Flußinjektion (0,3 ml/min) dem Massenspektrometer zugeführt und mit einer Sprühspannung von 3,3 kV ionisiert. Die Fragmente wurden über ihre molekulare Massen bestimmt. Die MS/MS-Analyse wurde im sogenannten *dependent scan*-Modus durchgeführt, d.h. das intensivste Ion wurde automatisch fragmentiert.

Lösungsmittel A: 5 % (v/v) Acetonitril in Wasser mit 0.025% (v/v) TFA

Lösungsmittel B: 95 % (v/v) Acetonitril in Wasser mit 0.025% (v/v) TFA

2.5 Peptidsynthese

Die Synthese der Peptide erfolgte mit dem Synthesizer EPS 221 (*Abimed*, Langenfeld) auf einer festen Phase unter Verwendung von Fmoc als Schutzgruppe der α -Aminogruppen der Aminosäuren (N α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Aminosäuren). Als Säulenharz wurde Tentagel-R-RAM (*Rapp-Polymere*) verwendet. Die Kopplung der Peptidbindung wurde mit Benzotriazol-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, *Novabiochem*) als Aktivator und 4-Methylmorpholin (NMM, *Fluka*) als Base vorgenommen. Der Synthesemaßstab betrug 100 μmol . Pro Kopplung wurden 500 μmol Fmoc-Aminosäuren verwendet. Nach der Kopplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin abgespalten. Zur Abspaltung der Peptidkette von der Matrix und der Entfernung der

permanenten Schutzgruppen wurde das Säulenharz in einem Polypropylengefäß vorgelegt und mit 10 ml Abspaltungslösung versetzt. Das Gefäß wurde verschlossen und 5 Stunden geschüttelt. Nach der Reaktionszeit wurde das Harz über eine Filterfritte durch die Reaktionssäule filtriert. Die Lösung wurde mit Druckluft aus der Reaktionssäule gedrückt und das Harz mit 1 ml TFA nachgewaschen. Das gelöste Peptid wurde durch Zugabe von 40 ml t-Butyl-Methylether gefällt. Die Präzipitation wurde 1 Stunde bei -20 °C vervollständigt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus) wurde die Etherlösung dekantiert, das Proteinpräzipitat in 40 ml Ether gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in 5 ml Wasser gelöst, in flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert. Die erste qualitative Analyse des Peptids erfolgte chromatographisch an einer Reversed Phase C18-Säule (RPC18-Säule) auf Beckman System Gold HPLC. Bei genügend hohem Reinheitsgrad wurde an einer präparativen RPC18-Säule die vollständige Reinigung vorgenommen. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 50 ml 10 % Lösungsmittel B in Lösungsmittel A. Das lyophilisierte Peptid wurde in 5 ml 10 % B gelöst und pro Lauf 1 ml injiziert. Die Elution des Peptids erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10 % auf 40 % Lösungsmittel B in A innerhalb 30 Minuten bei einem Fluß von 1 ml/min. Das Eluat wurde mit einem Detektor durch Messen der OD₂₂₀ verfolgt, gesammelt und lyophilisiert.

Abspaltungslösung: 9 ml TFA; 0,35 ml Triethylsilan; 0,35 ml H₂O; 0,3 ml Thioanisol

Lösungsmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in H₂O

Lösungsmittel B: 0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril

Die massenspektrometrische Analyse der Peptide erfolgte über ESI-MS bei *A&M GmbH* in Bergheim.

2.6 Renaturierung von AtERabp1

2.6.1 Expression und Extraktion von AtERabp1

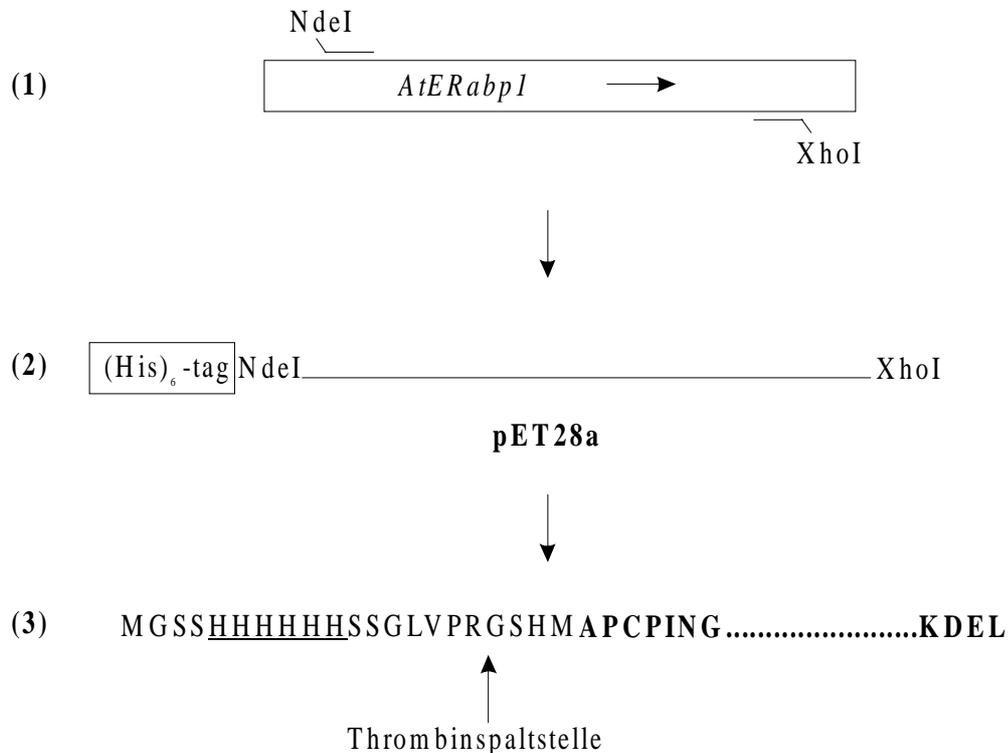


Abb. 3: Klonierung und Expression des Hexahistidin-AtERabp1-Fusionsproteins. Die AtERabp1-cDNA wurde ohne die ER-Signalsequenz mittels PCR amplifiziert (1) und in den Expressionsvektor pET28a kloniert (2). AtERabp1 wurde als Fusion mit einem N-terminalen Peptid exprimiert, das mit dem Enzym Thrombin zum größten Teil abgespalten werden kann (3). Die sechs Histidinreste sind unterstrichen, N- und C-Terminus von AtERabp1 sind fett hervorgehoben.

Die Expression von AtERabp1 erfolgte als Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidinrest unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die cDNA von AtERabp1 wurde ohne die N-terminale ER-Signalsequenz mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pET28a kloniert. (Abb. 3). Die Sequenz wurde auf Fehler überprüft und der Vektor in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert. Es wurden 100 ml TY-Medium mit einer Kolonie *E. coli* BL21AtERabp1 angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Ein Liter TY-Medium wurde mit 20 ml der Übernachtskultur angeimpft. Nachdem die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 gewachsen waren, wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und die Kultur 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden 30 Minuten bei 4000 rpm (GS3-Rotor) und 4 °C sedimentiert, in 150 ml Puffer A resuspendiert und mit einer french press (2 kbar) aufgeschlossen. Die inclusion bodies wurden bei 8000 rpm (GS3 Rotor) und 4°C sedimentiert und über Nacht bei 4 °C in 100 ml Puffer B gelöst.

Puffer A: 100 mM Tris/HCl pH8,0; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂
 Puffer B: 100 mM Tris/HCl, pH8,5; 6 M Guanidiniumchlorid; 100 mM DTT

2.6.2 Gelfiltration auf einer Sephadex G-25-Säule

Die Gelfiltration wurde dazu verwendet, die Proteinlösungen umzupuffern und diente weiterhin der Entfernung von Verunreinigungen und DTT vor der Applikation auf die Ni-NTA-Säule.

Die G-25-Säule (500 ml Säulenvolumen) wurde mit 1 l Puffer C äquilibriert und die Proteinlösung appliziert. Das Eluat wurde mit einem Detektor durch Messen der OD₂₈₀ auf seinen Proteingehalt geprüft und in Fraktionen zu je 20 ml gesammelt. Zur Regeneration wurde die Säule mit 20 ml 10 % Essigsäure und anschließend mit 20 ml 1 M Tris pH 8,0 gewaschen.

Puffer C: 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 6 M Guanidinium/HCl

2.6.3 Reinigung über eine Ni-NTA-Säule

Die Ni-NTA-Säule wurde mit 10 ml 1 M NiSO₄ beladen und mit 10 ml 1 M Tris pH 8,0 sowie 200 ml Puffer C gewaschen. Die Proteinfractionen wurden appliziert und die Säule dann mit ca. 100 ml Puffer C gespült. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 30 ml 20 mM EDTA in Puffer C eluiert. Mit einem Kollektor wurden 15 ml Fraktionen gesammelt, die OD₂₈₀ gemessen und aufgezeichnet. Die mit dem Elutionsdiagramm ermittelten proteinhaltigen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert.

Puffer C: 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 6 M Guanidinium/HCl

2.6.4 Renaturierung von AtERabp1

(modifiziert nach de Bernardez Clark *et al.*, 1999)

Das denaturierte Protein wurde rasch 1:100 in Puffer 1 verdünnt und bei 10 °C 24 Stunden gerührt. Die Proteinlösung wurde mehrmals in einer Ultrafiltrationszelle (*Amicon*) über einen Diaflo[®] Ultrafilter eingengt und mit Puffer aufgefüllt. Nach dem letzten Einengen wurde die Proteinlösung mit Puffer 2 auf ein Volumen von 10 ml gebracht, eine Stunde bei 100000g zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Puffer 1: 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 5 mM Glutathion (reduzierte Form); 1 M Arginin; 10 mM EDTA

Puffer 2: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

2.6.5 Fluoreszenzspektroskopie

Diese Methode diente der schnellen Überprüfung der Rückfaltung sowie der Bestimmung von Dissoziationskonstanten. Die intrinsische Fluoreszenz von rekombinantem AtERabp1 wurde mit einem Scanning Fluoreszenzspektrometer (SFM 25, *Kontron*) in einer 1x1 cm

Quarzküvette gemessen. Die Probe wurde während der Messung gerührt und auf 10 °C temperiert. Im Falle der Titration mit 1-NAA wurde 1 ml der Proteinlösung mit 900 µl 100 mM Tris pH 8,0 verdünnt und mit 100 µl 10 x Puffer versetzt. Anschließend wurde mit verdünnter Salzsäure der pH-Wert auf 5,5 titriert. Jeweils nach Zugabe einer Probe des Liganden wurde durch Pipettieren gemischt und die Messung nach drei Minuten Inkubationszeit durchgeführt. Dies diente einerseits der Temperierung und andererseits der Gleichgewichtseinstellung von Protein und Ligand (Lilie, pers. Mitteilung). Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Emission wurde von 300 bis 400 nm mit einer Geschwindigkeit von 1 nm/s und einer Meßgenauigkeit von 0,1 nm detektiert. Die Bandbreite betrug 10 nm sowohl für die Anregung als auch für die Emission. Der Fluoreszenzbeitrag von Lösungsmittel und Ligand wurde durch eine analoge Titration ermittelt und von der Protein-Ligand-Titration subtrahiert.

10 x Puffer: 1 M NaAc pH 5,5; 50 mM MgCl₂

2.6.6 Berechnung der Dissoziationskonstanten

Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten K_D des Protein-Ligand-Komplexes wurde von einem einfachen Bindungsmodell ausgegangen. Für die Dissoziation des ABP-Ligand-Komplexes (1) gilt das Massenwirkungsgesetz (2) und die Erhaltungsgleichungen (3a und 3b):



Massenwirkungsgesetz

$$K_D = \frac{[ABP][L]}{[ABPL]} \quad (2)$$

Erhaltungsgleichungen

$$[ABP]_0 = [ABP] + [ABPL] \quad (3a)$$

$$[L]_0 = [L] + [ABPL] \quad (3b)$$

[ABPL]	Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes
[ABP]	freie Proteinkonzentration
[ABP] ₀	Gesamtproteinkonzentration
[L]	freie Ligandenkonzentration
[L] ₀	Gesamtligandenkonzentration
K_D	Dissoziationskonstante des Protein-Ligand-Komplexes

Zur Berechnung der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes werden die Erhaltungsgleichungen in das Massenwirkungsgesetz eingesetzt (3a und 3b in 2). Daraus ergibt sich nach Umformung die quadratische Gleichung

$$0 = [ABPL]^2 - [ABPL]([ABP]_0 + [L]_0 + K_D) + [ABP]_0[L]_0 \quad (4)$$

mit der folgenden physikalisch sinnvollen Lösung:

$$[ABPL] = \frac{[L]_0 + [ABP]_0 + K_D - \sqrt{([L]_0 + [ABP]_0 + K_D)^2 - 4[ABP]_0[L]_0}}{2} \quad (5)$$

Die Abnahme des Fluoreszenzsignals im Gleichgewicht bei steigender Zugabe von freiem Liganden ist gleich dem Bindungsgrad $[ABPL]/[ABP]_0$, multipliziert mit der maximalen Änderung, die bei Sättigung erhalten wird. Damit ergibt sich das Gesamtsignal F aus der Summe des Fluoreszenzsignals ohne Ligand und der partiellen Signaländerung bei Ligandenzugabe, sowie die Fluoreszenz des Liganden im Lösungsmittel.

Für das Fluoreszenzsignal F gilt:

$$F = F_{ABP} - (F_{ABP} - F_{ABPL}) \frac{[ABPL]}{[ABP]_0} + F_L [L] \quad (6)$$

mit

F_{ABP}	Fluoreszenzsignal der Proteinlösung bei $[L] = 0$
F_{ABPL}	Fluoreszenzsignal des Protein-Ligand-Komplexes (nach Sättigung mit $[L]$)
F_L	Fluoreszenz von L im Lösungsmittel

Alle Fluoreszenzwerte wurden auf das Fluoreszenzsignal bei $[L] = 0$ normiert ($F_{ABP} = 1$). Der Term $[L]F_L$ ist die Eigenfluoreszenz des Liganden im Puffer. Dieser Wert wurde bereits vor der graphischen Darstellung der Titrationskurve vom Meßwert der Protein-Ligand-Titration subtrahiert.

Somit ergibt sich nach Einsetzen von (5) in (6) für die korrigierte Fluoreszenz F_C :

$$F_C = F_{ABP} - (F_{ABP} - F_{ABPL}) \frac{[L]_0 + [ABP]_0 + K_D - \sqrt{([L]_0 + [ABP]_0 + K_D)^2 - 4[ABP]_0[L]_0}}{2[ABP]_0} \quad (7)$$

Ein Kurvenangleich an die Meßdaten unter Verwendung von Gleichung (7) mit konstanter Proteinkonzentration $[ABP]_0$ und den Angleich-Parametern F_{ABPL} , F_{ABP} und K_D liefert die Dissoziationskonstante K_D . Diese nichtlineare Regressionsanalyse wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (*Sigma Plot*) durchgeführt.

2.7 Antikörperherstellung und Reinigung

2.7.1 Kopplung der Peptide an Keyhole Limpet Hemocyanin

Da Peptide häufig nicht in der Lage sind, eine starke Immunantwort zu stimulieren, müssen sie an Trägerproteine gekoppelt werden. Die Peptide wurden nach Angaben des Herstellers an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt. Nach der Kopplung der Peptide wurde das Konjugat gegen 4 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert. Es wurde auf 1 ml mit PBS aufgefüllt, die Lösung in 100 µl Portionen aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

PBS: 7 mM Na₂HPO₄/1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl,

2.7.2 Immunisierung der Kaninchen

Die Immunisierung der Kaninchen mit den Peptiden wurde von der Firma *Eurogentec Bel S. A.*, Ougrée durchgeführt. Sämtliche Injektionen erfolgten subkutan.

2.7.3 Reinigung der Antikörper

2.7.3.1 Ammoniumsulfatpräzipitation

Dem Kaninchenantiserum wurde unter Rühren über einen Zeitraum von 2 Stunden ein Volumenteil Ammoniumsulfatlösung (1 g/ml) in PBS bei 4 °C zugetropft. Nach weiteren 5 Stunden bei 4 °C war die Fällung der Antikörper vervollständigt. Die Suspension wurde 30 Minuten zentrifugiert (SS34-Rotor, 15000 rpm, 4 °C) und der Niederschlag in 10 ml PBS aufgenommen. Es folgte eine ausgiebige Dialyse über Nacht bei 4 °C gegen PBS.

2.7.3.2 Affinitätschromatographie der Anti-Peptid-Antikörper

Die Affinitätsreinigung der Antikörper erfolgte über eine Säule mit immobilisiertem Antigen. Die Kopplung erfolgte über die Sulfhydrylgruppe der Cysteine nach Angaben des Herstellers (Sulfo Link-Kopplungsgel, *Pierce Chemical Company*). Das vorgereinigte Antiserum (5 ml) wurde 30 Minuten bei 30000 rpm und 4 °C zentrifugiert (TL-100 Ultrazentrifuge) und auf die vorbereitete Affinitätssäule gegeben. Zur quantitativen Bindung wurde das Eluat der Antikörper zweimal appliziert. Es wurde mit 20 ml PBS gewaschen und anschließend mit 8 ml Elutionspuffer 1 eluiert. Um das saure Eluat schnell zu neutralisieren, wurden 1 ml Fraktionen in Vorlagen mit 400 µl Neutralpuffer 1 gesammelt. Die Säule wurde mit 10 ml PBS neutralisiert und dann mit 8 ml Elutionspuffer 2 eluiert. Fraktionen von 1 ml wurden in Vorlagen mit 400 µl Neutralisationspuffer 2 auf einen physiologischen pH-Wert eingestellt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch Messung der OD₂₈₀ bestimmt und die proteinhaltigen Fraktionen ausgiebig bei 4 °C jeweils gegen PBS dialysiert. Schließlich wurden die gereinigten Antikörper durch Inkubation in 90 % (w/v) PEG 40000 in PBS auf ca. 2 ml eingengt, schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Waschpuffer:	1 M NaCl
PBS:	7 mM Na ₂ HPO ₄ /1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl
Elutionspuffer 1:	20 mM NaAc pH 2,5
Elutionspuffer 2:	20 mM Ethanolamin pH 11,5
Neutralpuffer 1:	1 M Tris/HCl pH 9,0
Neutralpuffer2:	1 M NaAc pH 5,0

2.8 Immuncytochemie

Das Pflanzengewebe wurde eine Stunde unter Vakuum in Fixierlösung inkubiert und anschließend 15 Minuten in PBS gewaschen. Die Dehydratisierung erfolgte über eine Ethanolserie (30, 50, 70, 90 und 97 % (v/v) Ethanol in PBS) für jeweils 30 Minuten. Anschließend wurde das Ethanol bei 37 °C in jeweils 1-2stündigen Schritten gegen Wachs ausgetauscht (Wachs:Ethanol – 1:2, 1:1 und 2:1 (v/v)). Schließlich wurde das Gewebe weitere zwei Stunden, über Nacht und am folgenden Tag nochmals zwei Stunden in 100 % Wachs inkubiert, in Formen transferiert und ausgehärtet. Das eingebettete Pflanzengewebe wurde mit Wachs auf einen Metallsockel fixiert und auf 14 °C gekühlt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 6 bis 10 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger übertragen wurden. Um eine regelmäßige Anordnung der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurden diese mit mehreren Wassertropfen benetzt, auf denen sich die Wachsschnitte ausstreckten. Die Präparate wurde bei RT mehrere Stunden oder über Nacht getrocknet. Dadurch hafteten die Pflanzenschnitte fest an der Glasfläche. Zur Rehydrierung wurden die Objektträger in folgende Lösungen getaucht: 97 % Ethanol (dreimal 10 Minuten), 90 % und 50 % Ethanol in PBS (je 10 Minuten) und schließlich 30 Minuten in PBS. Es folgte eine 10minütige Inkubation in auf -20 °C vorgekühltem Methanol mit anschließender Äquilibrierung in PBS (30 Minuten). Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:20 bis 1:100 Verdünnung in 1% Milchpulver in PBS) erfolgte 1,5 Stunden in einer feuchten Kammer. Als Kontrollexperiment erfolgte die Primärantikörperinkubation in Gegenwart des Antigens (100facher molarer Überschuss des Peptids). Nach dreimaligem Waschen mit PBST (jeweils 5 Minuten) wurde der Sekundärantikörper (1:100 Verdünnung in 1% Milchpulver in PBS) appliziert und die Präparate ebenfalls 1,5 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Es schlossen sich drei fünfminütige Waschschrte mit PBST gefolgt von einem Waschschrte mit PBS an. Die markierten Schnitte wurden zur mikroskopischen Auswertung unter 50 % Glycerin mit einem Deckglas eingeschlossen und mit Nagellack versiegelt.

PBS:	7 mM Na ₂ HPO ₄ /1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl
PBST:	0,2% (v/v) Tween 20 in PBS
Wachs:	10 % (w/v) 1-Hexadecanol in PEG 960

2.9 Kultivierung von *A. thaliana* Pflanzen

2.9.1 Oberflächensterilisation von Samen

Die Sterilisation der Samen erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit einer Lösung aus 5 % (w/v) Ca(OCl)₂ + 0,02 % (v/v) Triton X-100 für 15 Minuten. Die maximale Füllhöhe der

Samen betrug 400 μ l. Die Lösung wurde abgenommen, und die Samen wurden zweimal mit je 1 ml H₂O gewaschen. Anschließend pipettiert man die Samen mit einem weiteren ml H₂O auf ein steriles 3 MM Papier in einer Petrischale. Nach dem Trocknen wurden die Petrischalen mit Parafilm abgedichtet und bei 4 °C gelagert.

2.9.2 Kreuzung der Reporterlinien mit einer Aktivatorlinie

Zur Aktivierung der zur Verfügung stehenden homozygoten Reporterpflanzen (Feckler, 1997) wurden diese mit einer Aktivatorlinie (Mohrs, 1997) gekreuzt. Die Samen der Reporterlinien wurden auf ARA Festmedium mit 15 μ g/ml Hygromycin und die Aktivatorlinie auf ARA Festmedium mit 100 μ g/ml Methotrexat in Petrischalen (\varnothing 14 cm) ausgelegt. Nach 10-14 Tagen wurden die resistenten Pflanzen, d. h. Keimlinge mit 4 oder mehr Blättern und deutlich längeren Wurzeln als nicht resistente Pflanzen, in neue Petrischalen umgesetzt und nach einer weiteren Woche in Erde überführt. Die Pflanzen wurden bis zur Blütenreife kultiviert. Zur Kreuzung wurden die Kelch-, Blüten- und Staubblätter der Reporterlinien entfernt und der freigelegte Stempel mit den reifen Staubblättern der Aktivatorlinie mehrmals bestrichen. Die gekreuzten Blütenstände wurden gekennzeichnet und die Pflanzen bis zur Samenreife kultiviert. Die geernteten Samen (T0-Generation) wurden wie unter 2.9.1 beschrieben sterilisiert und auf ARA Festmedium mit 15 μ g/ml Hygromycin und 100 μ g/ml Methothrexat in Petrischalen (\varnothing 14 cm) ausgelegt. Nach 10-14 Tagen wurden die resistenten Pflanzen in neue Petrischalen umgesetzt und nach einer weiteren Woche in Erde überführt.

2.9.3 Herstellung von Wurzelkulturen

Die Anzucht von *A. thaliana* Wurzelkulturen erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml ARA Flüssigmedium und ca. 15 zwei Wochen alten, auf ARA Festmedium angezogenen Keimlingen. Die Kolben wurden in einer Kulturkammer (21 °C, 16 h Photoperiode und 75 % Luftfeuchtigkeit) bei 80 rpm für 2 Wochen geschüttelt.

2.10 Funktionelle Analyse von ZmERabp1

2.10.1 Herstellung von Protoplasten aus Maiskoleoptilen

Maissamen (*Zea mays* L., cv Garant) wurden über Nacht gewässert und fünf Tage auf feuchtem Zellstoff bei 26 °C im Dunkeln keimen gelassen. Die Koleoptilen wurden gerntet, die Oberfläche mit Siliciumcarbidpulver abgerieben und die Spitze (3 mm) entfernt. Etwa 1 cm große Stücke der Koleoptile ohne Primärblatt wurden zerkleinert und 4,5 Stunden in Enzymlösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Nylonnetze mit Porengrößen von 100, 50 und 30 μ M filtriert und die Protoplasten in Puffer überführt.

Enzymlösung: 1 % (w/v) Cellulase Onozuka RS (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan); 0.075 % (w/v) Pectolyase Y-23 (Kikkoman Corporation, Tokyo, Japan); Makro- und Mikroelemente nach Krautwig, 1993

Puffer: 10 mM MES, pH 6,5; 1 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 0,33 osmolar mit Mannitol

2.10.2 Volumenbestimmung der Protoplasten

Die Protoplasten (ca. 20) wurden in eine Mikrotiterplatte mit 20 µl Puffer transferiert. Um Änderungen in der Osmolarität zu vermeiden, wurde die Platte mit einer Abdeckung versehen. Die Zugabe von Agenzien erfolgte mittels einer Pipette durch die Abdeckung. Einzelne Protoplasten wurden fotografiert und die erhaltenen Bilder wurden auf die Oberfläche eines Grafiktablets (*Genius*) projiziert. Mit Hilfe eines digitalen Stifts wurde der Umfang bestimmt und das Volumen mit einer eigens entwickelten Software (*Lüthen*) berechnet. Da die relativen Volumina unbehandelter Protoplasten mit einer linearen Funktion abnahmen, wurden die gemessenen Werte um diese Funktion korrigiert. Jedes Experiment wurde mit fünf bis 20 einzelnen Protoplasten wiederholt.

Puffer: 10 mM MES, pH 6,5; 1 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 0,33 osmol mit Mannitol

2.10.3 Wachstumsmessungen von Maiskoleoptilen

Die Wachstumsmessungen wurden mit einem sog. Auxanometer, bestehend aus sechs parallel geschalteten Winkelgeber-Apparaturen, an aufgerauhten Maiskoleoptilen durchgeführt (nach Lüthen und Böttger 1992). Dieses Auxanometer ermöglicht die Messung des Wachstums simultan in sechs Versuchsgefäßen.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen von AtERabp1 in *A. thaliana*

3.1.1 Northern-Blot-Analysen

Da bisherige Northern-Blot-Analysen des *AtERabp1*-Gens basierend auf total-RNA-Präparationen erfolglos blieben, mußte von einer sehr niedrigen Transkriptmenge in den analysierten Geweben ausgegangen werden. Deshalb war die Isolierung von Poly(A)⁺-RNA notwendig, um die Proben mit mRNA anzureichern. Folgende Gewebe wurden analysiert: Rosettenblätter und Hypokotyle von 4 Wochen alten Pflanzen, Sproßachsen und Blüten von 6 Wochen alten Pflanzen und Wurzeln von 4 Wochen alten Wurzelkulturen. In allen analysierten Geweben konnte ein Signal bei einer Größe von etwa 1 kb detektiert werden. Als Sonde wurde die *AtERabp1*-cDNA verwendet. Zur Quantifizierung der Signale wurde mit einer Ubiquitinsonde hybridisiert (Abb. 4 A). Trotz spektroskopischer Bestimmung der aufgetragenen RNA-Menge zeigte die Ubiquitinkontrolle unterschiedliche Signalstärken. Deshalb wurde das *AtERabp1*-Signal auf das jeweilige Ubiquitinsignal normiert (Abb. 4 B). Ein Vergleich der Signalstärken zeigte bei Normierung auf das Signal in Blüten (100 %) abnehmende Transkriptmengen in Hypokotyl (35 %), Rosettenblättern (26 %), Sproßachsen (12 %) und Wurzeln (8 %). Die unterschiedlichen Signalstärken der untersuchten Gewebe weisen darauf hin, daß die Transkription des *AtERabp1*-Gens gewebespezifisch reguliert wird.

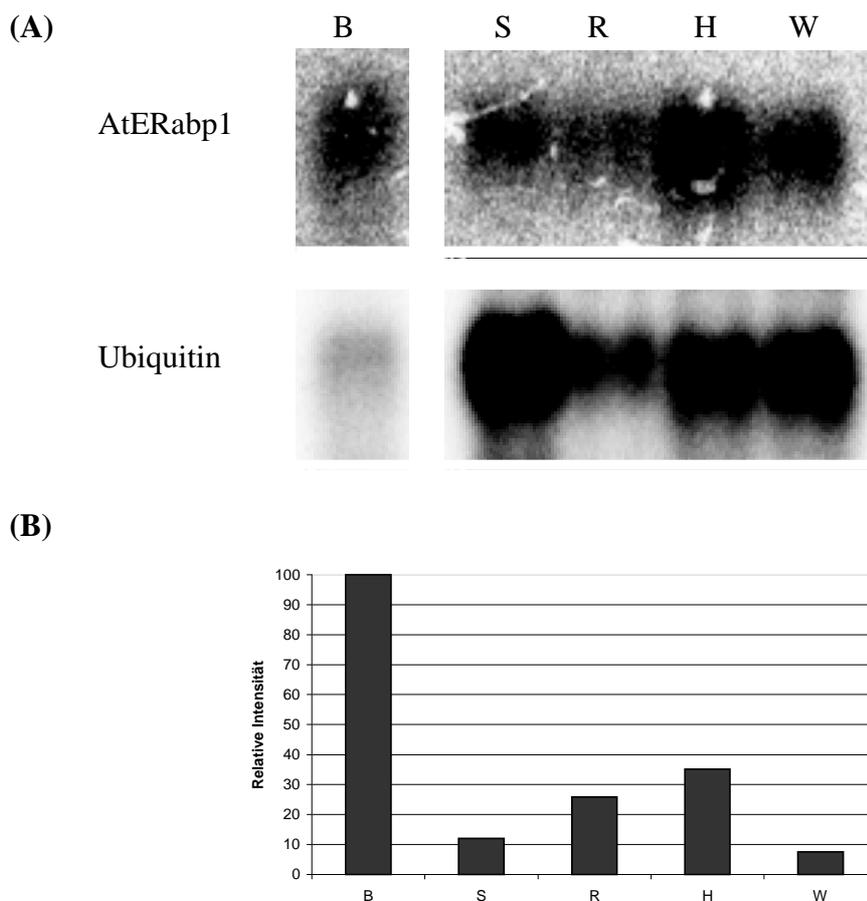


Abb. 4: Northern-Blot-Analyse von *A. thaliana* Wildtyppflanzen. (A) Jeweils 1 μg Poly(A)⁺-RNA wurde aus *A. thaliana* Gewebe isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der *AtERabp1*-cDNA bzw. mit einer *Ubiquitin* cDNA. B: Blüten, S: Sprossachsen, R: Rosettenblätter, H: Hypokotyle, W: Wurzeln. (B) Die Quantifizierung erfolgte durch Computeranalyse mit Hilfe des Programms *ImageQuant*. Die *AtERabp1*-Signale wurden auf die Ubiquitinsignale normiert und dem Signal in Blüten wurde die relative Intensität 100 % zugewiesen.

3.1.2 Western-Blot-Analysen

Spezifische Antikörper stellen wichtige Werkzeuge für die Analyse von Proteinen dar. Sie ermöglichen die Detektion des zu untersuchenden Proteins in Proteinextrakten durch Western-Blot-Analysen. In histologischen Studien können Informationen über die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisierung gewonnen werden. Aus diesen Gründen wurde ein anti-Peptidantikörper gegen *AtERabp1* hergestellt und auf seine Spezifität hin überprüft. Des weiteren wurde der Antikörper zur Detektion von *AtERabp1* in Gewebe von *A. thaliana* verwendet.

3.1.2.1.1 Herstellung eines spezifischen anti-AtERabp1-Peptidantikörpers

Mittels Computeranalyse (*DNASTAR*) wurde eine Sequenz aus der Primärsequenz von AtERabp1 gewählt, die eine hohe Immunogenität aufweist. Diese Sequenz überlappt zum größten Teil mit der Box A, die in allen Auxin-bindenden Proteinen hochkonserviert ist. Um mögliche Kreuzreaktionen des herzustellenden Antikörpers auszuschließen, wurde in einer Datenbank-Recherche Sequenzen gesucht, die zu dem gewählten Peptid homolog waren. Ausgenommen von AtERabp1 wurden keine Proteine aus *A. thaliana* gefunden. Zur Herstellung des anti-Peptidantikörpers wurde das folgende Peptid mit dem Synthesizer EPS 221 (*Abimed*) hergestellt:

NH₂-SETPIHRHSCEE-COOH

Das Peptid wurde über die Thiolgruppe des Cysteinrestes an KLH gekoppelt und zur Immunisierung in Kaninchen injiziert (*Eurogentec*). Durch Ammoniumsulfatpräzipitation wurden die Antikörper vom Serum getrennt und anschließend auf einer Affinitätssäule mit dem immobilisierten Peptid gereinigt. Die Immobilisierung des Peptids erfolgte ebenfalls über die Sulfhydrylgruppe des Cysteinrestes.

In Western-Blot-Analysen wurden mikrosomale Proteine aus Rosettenblättern von *A. thaliana* mit dem affinitätsgereinigten anti-AtERabp1-Peptidantikörper untersucht. Der Antikörper zeigte eine spezifische Immunreaktion, die durch einen Überschuss des Antigens gehemmt werden konnte (Abb. 5). Das Signal wurde bei einer apparenten molekularen Masse von ca. 24 kDa detektiert. Die aus der Primärsequenz berechnete molekulare Masse beträgt 18,64 kDa. AtERabp1 besitzt zwei theoretische Glykosylierungssequenzen. Unter der Annahme, daß die beiden Zuckerstrukturen dem in ZmERabp1 identifizierten mannosereichen Typ entsprechen (vgl. 3.3), beträgt die molekulare Masse ca. 22,4 kDa, in guter Übereinstimmung mit dem detektierten Signal.

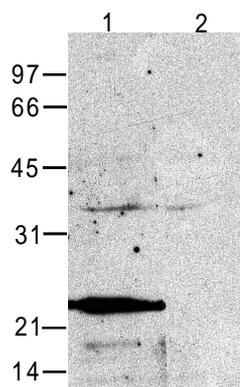


Abb. 5: Western-Blot-Analyse mit Kompetitionskontrolle. Mikrosomale Proteine aus *A. thaliana* Rosettenblättern (100 μ g) wurden über SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde geteilt und mit anti-AtERabp1-Peptidantikörper (1) bzw. mit Antikörper und Antigen (2) inkubiert.

3.1.2.2 Western-Blot-Analysen von AtERabp1

In Northern-Blot-Analysen wird die in den untersuchten Geweben vorhandene mRNA-Menge bestimmt. Um die Expression des *AtERabp1*-Gens auch auf Proteinebene zu überprüfen, sollten Western-Blot-Analysen mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper durchgeführt werden. Dazu wurden aus denselben Geweben, die für die mRNA-Isolierung verwendet wurden, Proteine der mikrosomalen Fraktion isoliert (Abb. 6). Die Signale in Blüten und Hypokotyl waren vergleichbar schwach, während Sproßachsen und Rosettenblätter ein ähnlich starkes Signal aufwiesen. Somit ist neben der mRNA-Expression auch die Proteinexpression gewebespezifisch; allerdings sind die Mengenverhältnisse genau entgegengesetzt (große Proteinmengen stehen geringen mRNA-Mengen gegenüber und umgekehrt).

Auffallend ist das sehr starke Signal in Wurzelgewebe, das zudem bei einer kleineren apparenten molekularen Masse (20 kDa) detektiert wurde. In allen untersuchten Geweben konnte ein schwaches Signal mit analoger molekularer Masse detektiert werden. Im Blütengewebe ist dieses Signal sogar stärker, als das Signal bei 24 kDa. Möglicherweise handelt es sich um eine prozessierte Form von AtERabp1.

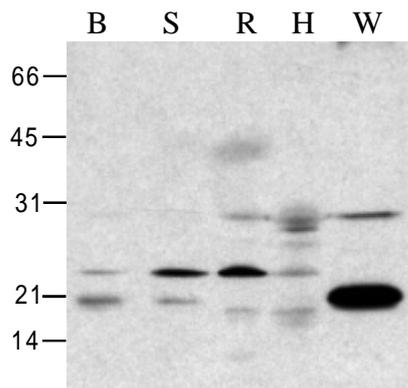


Abb. 6: Western-Blot-Analyse mikrosomaler Proteine aus Rosettenblättern von *A. thaliana*. Jeweils 100 μ g Protein wurden über SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von AtERabp1 erfolgte mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper. B: Blüten; S: Sproßachsen; R: Rosettenblätter; H: Hypokotyle; W: Wurzeln.

3.1.3 Immunfluoreszenzmarkierung von AtERabp1

Die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisierung eines Proteins erlaubt Rückschlüsse auf dessen mögliche Funktionen. Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen der Western-Blot-Daten sollte AtERabp1 in Wurzeln auf zellulärer Ebene lokalisiert werden. Ferner gibt es Hinweise, daß AtERabp1 eine wichtige Funktion in der frühen Embryonalentwicklung spielt (Chen *et al.*, 2000). Daher wurden zusätzlich Schoten von *A. thaliana* untersucht. Durch die Verwendung der indirekten Immunfluoreszenztechnik mit FITC-gekoppelten Antikörper sollte die Sensitivität erhöht werden.

3.1.3.1 Lokalisierung von AtERabp1 in Wurzeln von *A. thaliana*

Für die Herstellung von Gewebeschnitten wurden vier Wochen alte Wurzelkulturen verwendet. Diese wurden fixiert, in PEG-Wachs eingebettet und Querschnitte mit einer Schichtdicke von 8 bis 10 μ m angefertigt. Die Detektion erfolgte mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (Abb. 7). Die mikroskopische Untersuchung der immunfluoreszenz-markierten Wurzelquerschnitte zeigte in jungem Wurzelgewebe ohne Xylem die Markierung aller Zellen. Die stark blau fluoreszierenden nicht markierten äußeren Zellen bilden die Calyptra (A). Die Dekonvolutionstechnik führt zu einer höheren optischen Auflösung mikroskopischer Bilder.

Streulicht, das aus anderen Ebenen oder von der Seite kommt, wird von einem Bildpunkt mathematisch subtrahiert. Ferner wird das gesamte Licht, das von jeweiligen Bildpunkt ausgeht, berechnet und wieder zum Bildpunkt zusammengefügt, auch wenn es nicht in der Fokusebene detektiert werden kann (McNally *et al.*, 1999). Das Signal des anti-AtERabp1-Peptidantikörpers zeigte trotz Anwendung dieser Technik keine eingeschränkte subzelluläre Lokalisierung, sondern es erstreckte sich über die gesamte Zelle. Ausgenommen davon sind radialsymmetrische Bereiche, die auf Vakuolen bzw. den Zellkern schließen lassen (B). In älteren Wurzeln, die, erkennbar an der blauen Autofluoreszenz, bereits Xylemelemente ausgebildet hatten, war eine deutliche Färbung des Zentralzylinders zu erkennen. Die Zellen von Endodermis und Cortex waren in diesem Entwicklungsstadium der Wurzel deutlich vergrößert und wiesen nur eine schwache bzw. kaum mehr detektierbare Markierung auf (C). Zur Kontrolle diente in diesem Entwicklungsstadium der Wurzel die spezifische Hemmung des Primärantikörpers mit einem Überschuß des zur Immunisierung verwendeten Peptids (D). Die grüne Fluoreszenz des FITC-Signals wurde vollständig gelöscht. AtERabp1 besitzt eine ER-Signalsequenz und ein ER-Retentionssignal und konnte ausschließlich in mikrosomalen Proteinpräparationen in Western-Blot-Analysen detektiert werden. Daher war eine Markierung von ER-Strukturen zu erwarten gewesen. Um auszuschließen, daß subzelluläre Strukturen bei der Präparation des Gewebes zerstört wurden, wurde ein Primärantikörper (MAC256) eingesetzt, der gegen den C-terminus von ZmERabp1 einschließlich des ER-Retentionssignals gerichtet ist (Napier *et al.*, 1988). Dieser Antikörper markierte ER-Proteine in tierischen Zellen und konnte in diesem System als ER-Marker eingesetzt werden (Napier *et al.*, 1992). Als Sekundärantikörper wurde ein Oregon-Green-Konjugat verwendet. Die Markierung mit MAC256 zeigte ein typisches ER-Muster und dokumentiert somit die Erhaltung subzellulärer Strukturen während der Gewebepräparation (E).

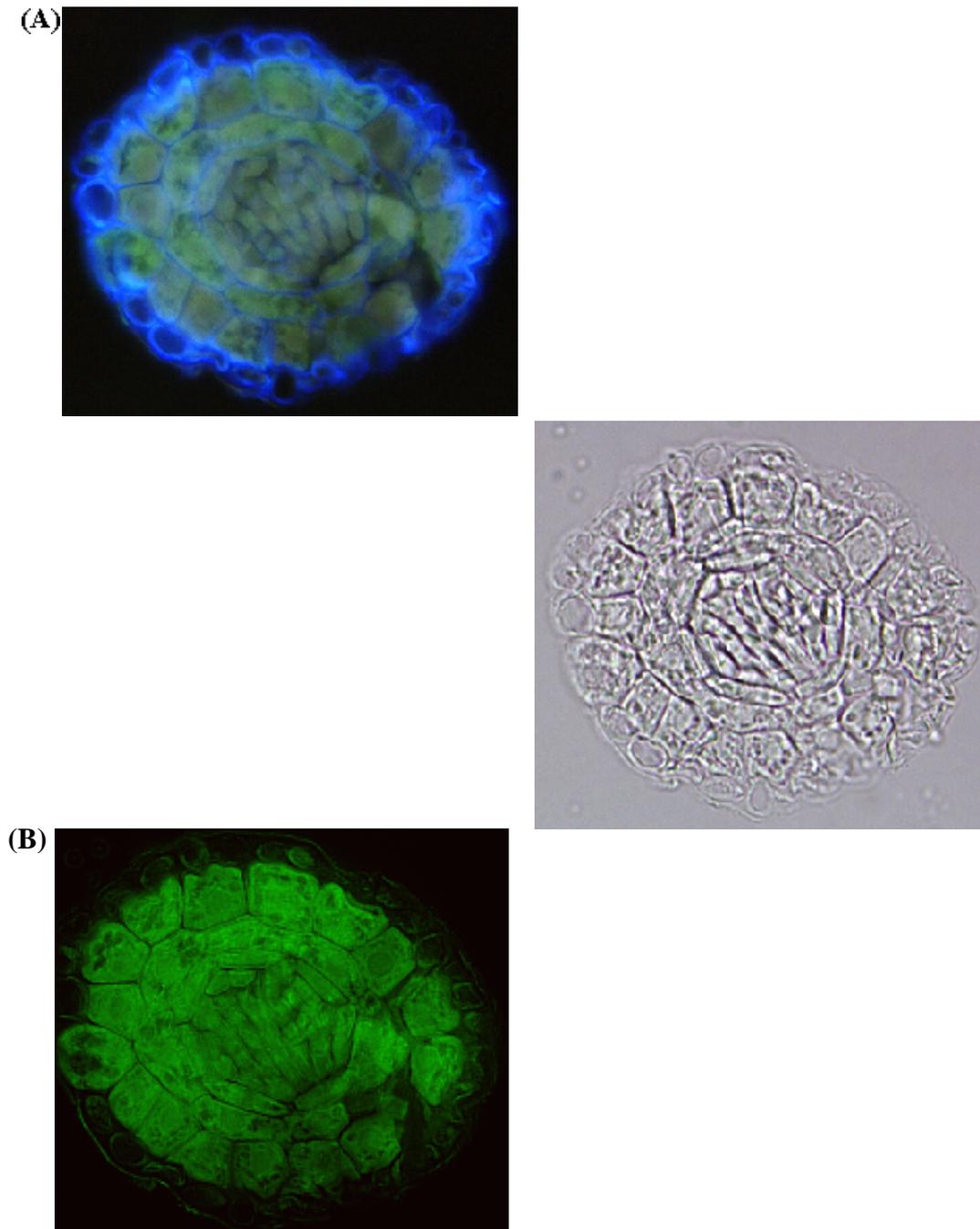


Abb. 7: Lokalisation von AtERabp1 in Wurzeln von *A. thaliana*. Mikroskopische Aufnahmen immunfluoreszenzmarkierter Wurzelquerschnitte. Verwendet wurde der affinitätsgereinigte anti-AtERabp1-Peptidantikörper bzw. ein affinitätsgereinigter anti-KDEL-Peptidantikörper. Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (A bis D) bzw. mit einem Oregon-Green-gekoppelten Sekundärantikörper (E). (A) relativ junges Wurzelgewebe markiert mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper; (B) dasselbe Objekt wie in (A) aufgenommen mit der Dekonvolutionstechnik; (C) älteres Wurzelgewebe markiert mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper; (D) Kontrolle mit 100fachem molarem Überschuß des Antigens zum anti-AtERabp1-Peptidantikörper; (E) relativ junges Wurzelgewebe markiert mit MAC256. Jeweils rechts neben den Fluoreszenzaufnahmen sind die entsprechenden Hellfeldaufnahmen abgebildet.

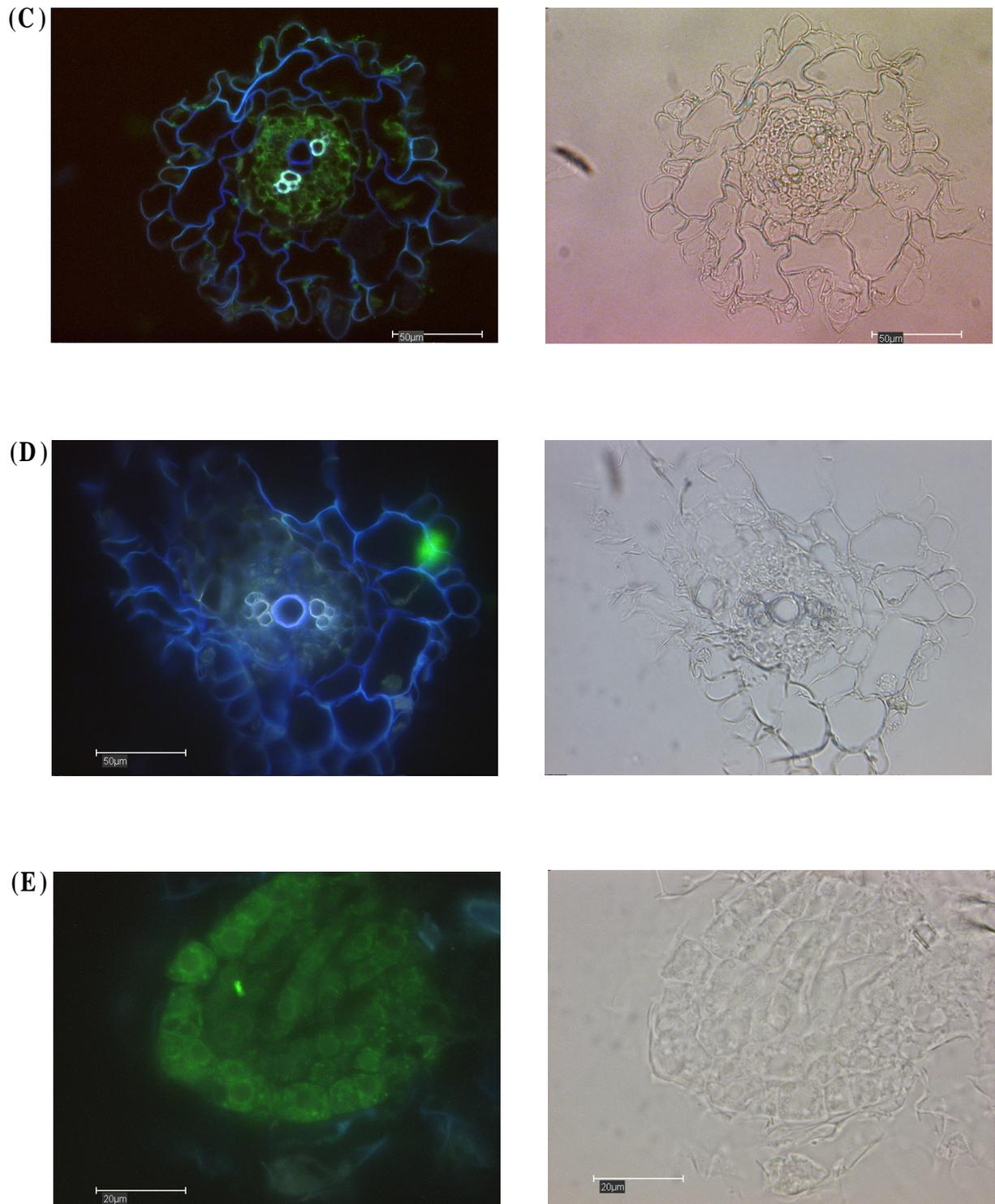


Abb. 7: Lokalisation von AtERabp1 in Wurzeln von *A. thaliana*. Legende s. vorhergende Seite.

3.1.3.2 Lokalisierung von AtERabp1 in Embryonen von *A. thaliana*

Es wurden Gewebeschnitte von unreifen grünen *A. thaliana* Schoten immuncytochemisch mit Hilfe des anti-AtERabp1-Peptidantikörpers und eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers analysiert. Dazu wurden die Schoten fixiert, in PEG-Wachs eingebettet und Schnitte mit einer Schichtdicke von 8 bis 10 μm angefertigt. Die Lokalisierung von AtERabp1 wurde in einigen Entwicklungsstadien der Embryogenese verfolgt (Abb. 8). In jungen Embryonalstadien bis hin zum Torpedostadium waren alle Zellen deutlich markiert (A-C). Außerdem wiesen sie ein der Markierung in Wurzelzellen analoges Signalmuster auf. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch die Konkurrenz mit seinem Antigen demonstriert (D). Ab dem gebogenen Keimblätterstadium wiesen Embryonen kein Fluoreszenzsignal mehr auf (E und F).

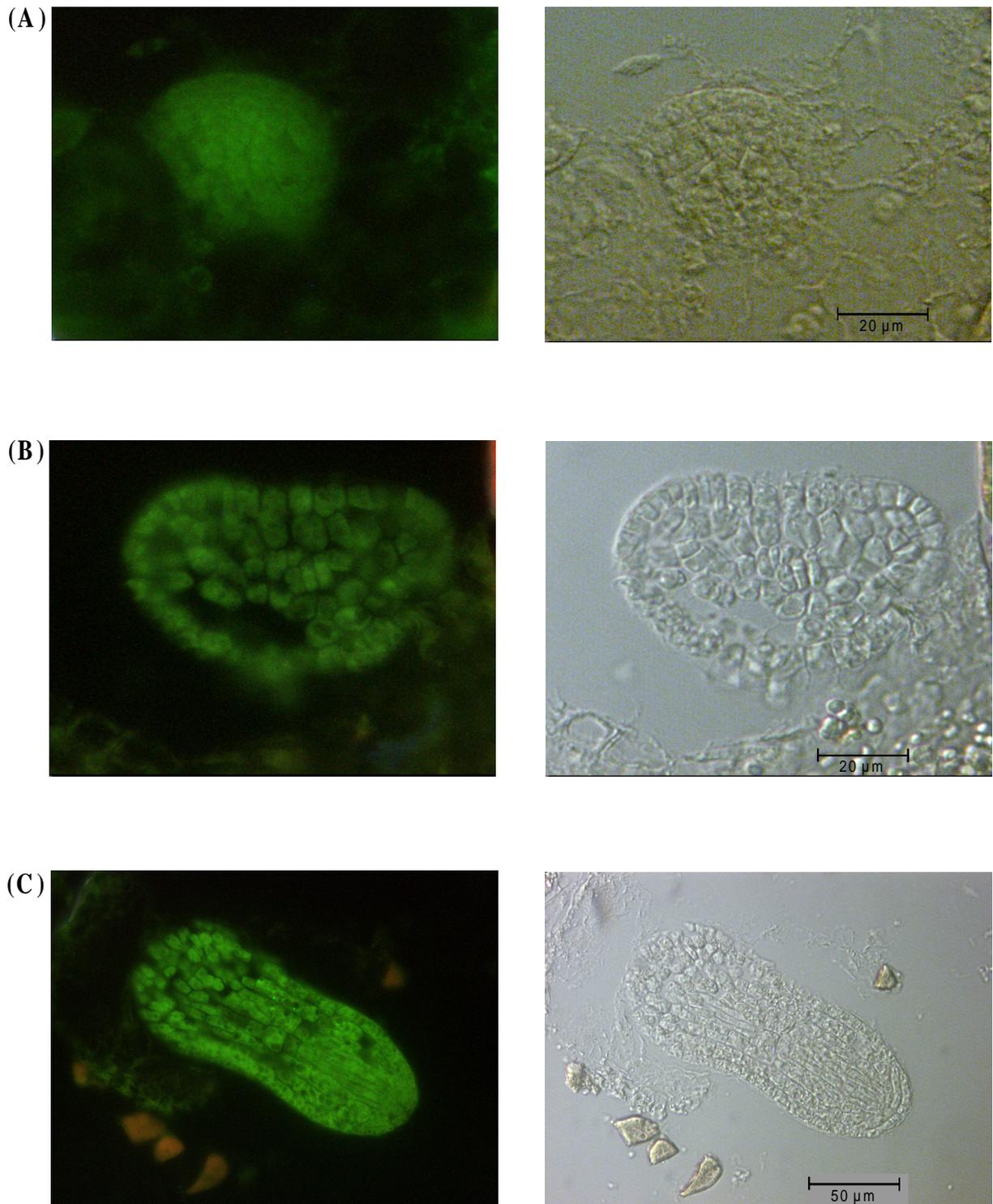


Abb. 8: Lokalisation von AtERabp1 in Embryonen von *A. thaliana*. Legende s. nächste Seite.

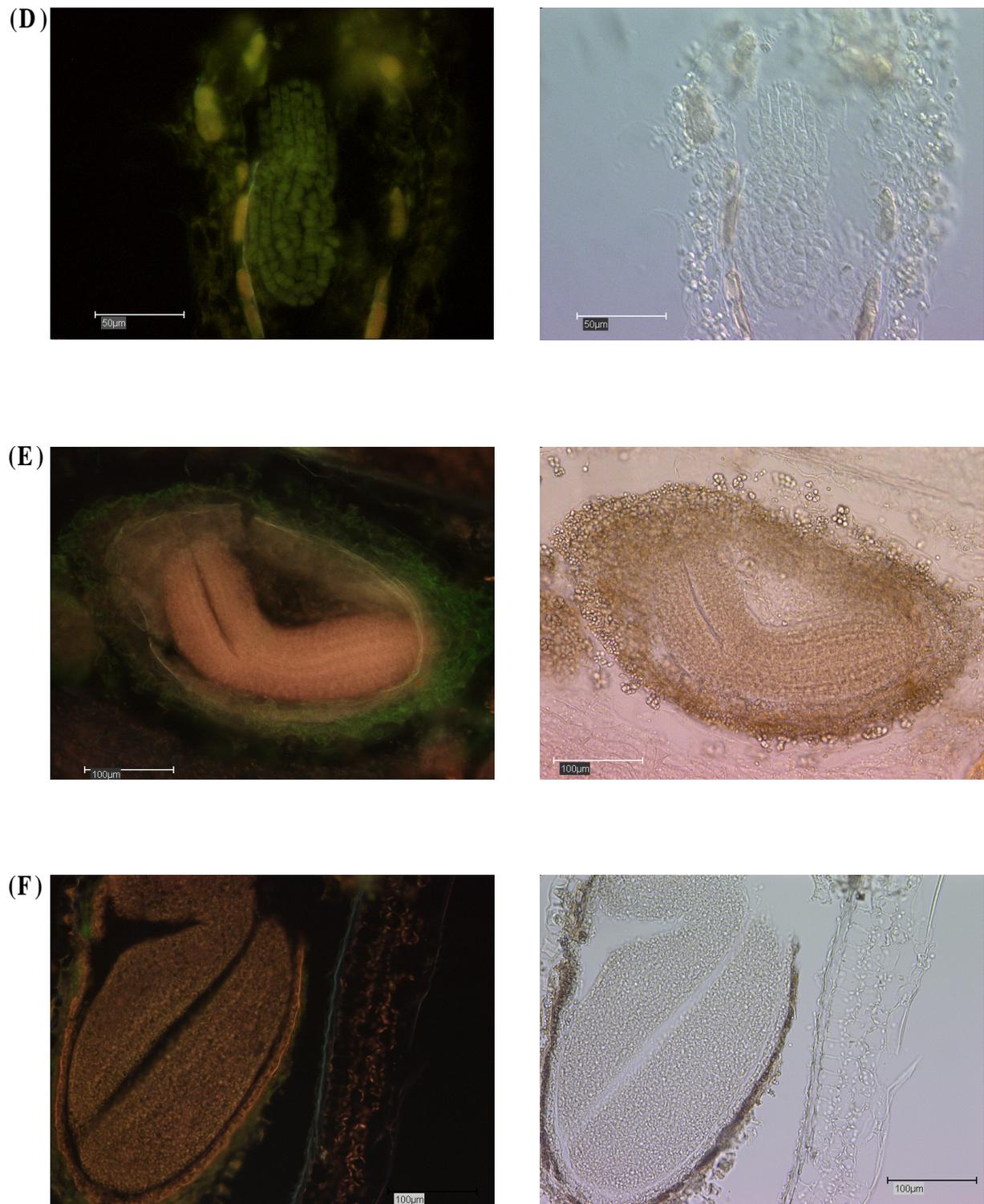


Abb. 8: Lokalisation von AtERabp1 in Embryonen von *A. thaliana*. Mikroskopische Aufnahmen immunfluoreszenzmarkierter Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Verwendet wurde der affinitätsgereinigte anti-AtERabp1-Peptidantikörper. Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. (A) Kugel-Stadium/Trianguläres Stadium; (B) Herz-Stadium; (C) Torpedo-Stadium; (D) Torpedo-Stadium, Kontrolle mit 100fachem molarem Überschuss des Antigens zum anti-AtERabp1-Peptidantikörper; (E) Gebogene Keimblätter-Stadium; (F) reifer Embryo. Jeweils rechts neben den Fluoreszenzaufnahmen sind die entsprechenden Hellfeldaufnahmen abgebildet.

3.2 Homologe Expression in *A. thaliana*

Das Auxin-bindende Protein aus *A. thaliana*, AtERabp1, ist vermutlich ein bedeutendes Protein in der Signaltransduktionskette von Auxin (Übersicht s. Venis und Napier, 1995; Jones 1998). Eine Veränderung in der natürlichen Expression könnte daher eine dramatische Auswirkung auf den Phänotyp haben. Die Expression der *AtERabp1*-cDNA in *sense*- und *antisense*-Orientierung unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven 35S-Promotors könnte bereits in einem frühen Entwicklungsstadium eine letale Auswirkung haben (Chen *et al.*, 2000). Mit der Anwendung aktivierbarer Promotoren kann eine kontrollierte Expression exogener DNA erreicht werden. Das Prinzip des verwendeten aktivierbaren Systems besteht in der Kreuzung zweier Pflanzenlinien (Moore *et al.*, 1998). Die Aktivatorpflanzen exprimieren unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promotors einen chimären Transkriptionsfaktor. Dieser Faktor ist ein Fusionsprotein einer hochaffinen DNA-Bindungsmutante des Lac-Repressors aus *E. coli* und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne des Gal4-Proteins aus *S. cerevisiae*. In den Reporterpflanzen befindet sich die exogene DNA unter der Kontrolle des aktivierbaren Promotors *pOp*. Dieser besteht aus zwei lac-Operatoren und einem Minimalpromotor. Nach der Kreuzung beider Linien bindet der Lac-Repressor an den Operator, und die Transaktivierungsdomäne bewirkt die konstitutive Expression der exogenen DNA. Im Gegensatz zur Expression unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven 35S-Promotors wird der Zeitpunkt der Aktivierung durch die Kreuzung beider Linien bestimmt. Ein auftretender Phänotyp kann daher direkt auf die Aktivierung zurückgeführt werden. Falls die Kreuzung des konstitutiven Aktivators mit dem Reporter letal für die Nachkommen sein sollte, besteht ferner die Möglichkeit, Aktivatorpflanzen zu verwenden, die den Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren exprimieren bzw. unter chemischer Kontrolle tragen.

Es standen transgene *A. thaliana* Pflanzen zur Verfügung, die die *AtERabp1*-cDNA in ihrem Genom in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung unter der Kontrolle des aktivierbaren Promotors *pOp* tragen (Feckler, 1997). Die Aktivierung wurde mit den zur Verfügung stehenden Aktivatorlinien durchgeführt und die Nachkommen analysiert.

3.2.1 Charakterisierung der *AtERabp1-sense*- und *antisense*-Pflanzen

Zu Beginn dieser Dissertation standen jeweils sechs aktivierbare *AtERabp1-sense*- und *antisense*-Pflanzen zur Verfügung. Zwei *AtERabp1-sense*- und drei *antisense*-Linien wurden mit einer Aktivatorlinie (Mohrs, 1998) gekreuzt. Die gebildeten Samen wurden geerntet, sterilisiert und auf Resistenzmedium ausgelegt. Nach 14 Tagen wurden die resistenten Keimlinge in Erde überführt und im Gewächshaus weiter kultiviert. Die Samen dieser T1-Linien (T2-Generation) wurden geerntet und für Transkriptionsanalysen und Immuno-Blots verwendet.

3.2.1.1 Northern-Blot-Analysen der T2-Generation

Zur Überprüfung der Transkription der aktivierten Pflanzen wurden Northern-Blot-Analysen in der T2-Generation durchgeführt (Abb. 9). Als Material dienten Rosettenblätter vier Wochen alter Pflanzen. Die Hybridisierung erfolgte mit der *AtERabp1*-cDNA. In allen analysierten Geweben wurde ein Signal bei einer Größe von etwa 1 kb detektiert. Zur Quantifizierung der Signale wurde mit einer Aktinsonde hybridisiert (A). Trotz spektroskopischer Bestimmung der aufgetragenen RNA-Menge zeigte die Aktinkontrolle unterschiedliche Signalstärken. Deshalb wurde das *AtERabp1*-Signal auf das jeweilige Aktinsignal normiert (B). Die Analyse zeigte in den Linien s1 und a20 eine starke Überexpression (13-fach bzw. 9-fach über Wildtypniveau) sowie in den Linien a13 und a23 eine schwache Überexpression des *AtERabp1-sense*- bzw. *antisense*-Transkripts (jeweils 3-fach über Wildtypniveau). Die Linie s6 zeigte keinen Effekt. Da die Analyse mit einer DNA-Sonde vorgenommen wurde, konnte nicht zwischen *sense*- und *antisense*-Transkript unterschieden werden.

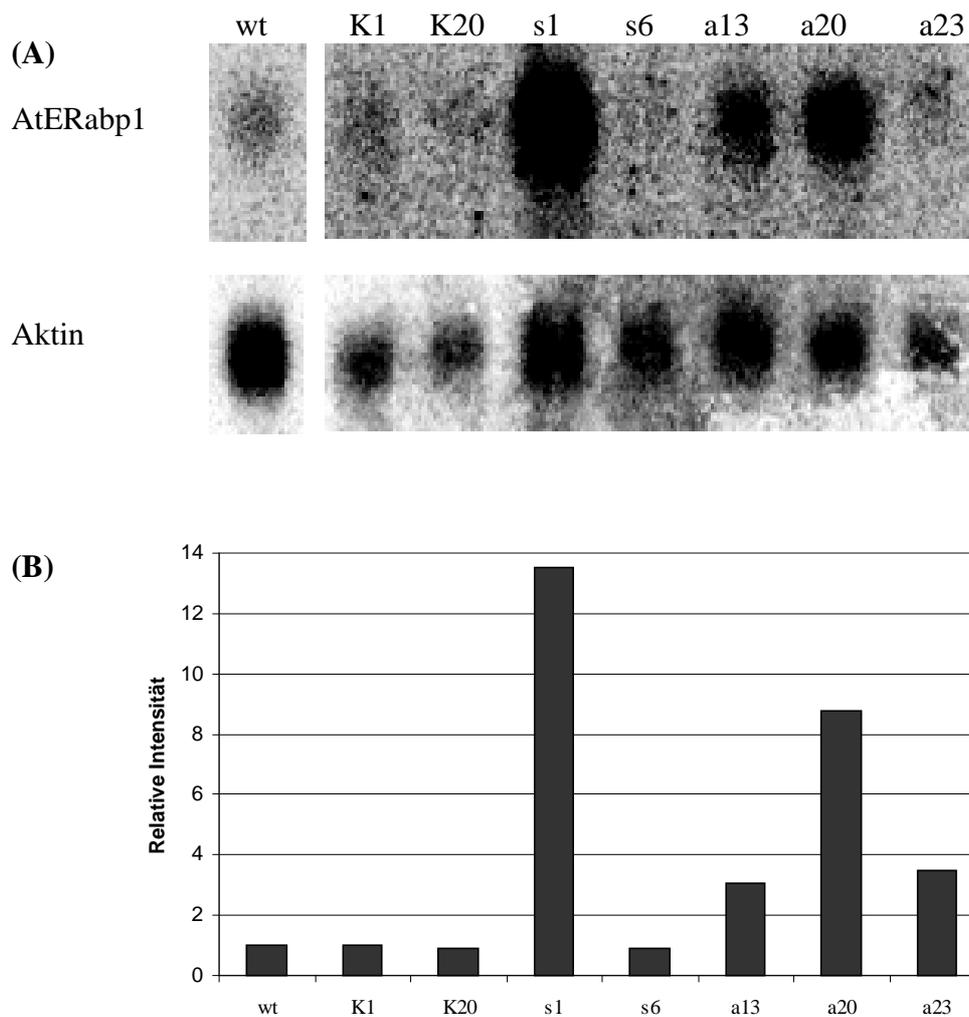


Abb. 9: Northern-Blot-Analysen der aktivierten *AtERabp1*-sense- und antisense-Pflanzen. (A) 1 μg Poly(A)⁺-RNA wurde aus Rosettenblättern isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der *AtERabp1*-cDNA bzw. mit einer *Aktin*-cDNA. wt: Wildtyp; K1: nicht aktivierte sense-Linie s1; K20: nicht aktivierte antisense-Linie a20; s1: aktivierte sense-Linie s1; s6: aktivierte sense-Linie s6; a13: aktivierte antisense-Linie a13; a20: aktivierte antisense-Linie a20; a23: aktivierte antisense-Linie a23. (B) Die Quantifizierung erfolgte durch Computeranalyse mit Hilfe des Programms *ImageQuant*. Dem Signal in Wildtyp wurde die relative Intensität 1 zugewiesen.

3.2.1.2 Western-Blot-Analysen der T2-Generation

Um eine mögliche Auswirkung des veränderten Transkriptspiegels insbesondere der Linien s1, a13, a20 und a23 auf Proteinebene zu verifizieren, wurden aktivierte und nicht aktivierte Pflanzen sowie die Aktivatorlinie im Vergleich zum Wildtyp einer Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 10). In allen Proben wurde ein Signal mit einer apparenten molekularen Masse von 24 kDa detektiert. Beim Vergleich der AtERabp1-Proteinmengen in den aktivierten Pflanzen mit den nicht aktivierten Pflanzen bzw. Wildtyp und Aktivatorlinie konnte keine signifikante Veränderung detektiert werden. Da ebenfalls beim phänotypischen Vergleich der aktivierten und nicht aktivierten Pflanzen kein Unterschied festzustellen war, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet. Es mußte davon ausgegangen werden, daß posttranskriptionelle Regulierungen in den aktivierten Pflanzen zu einer Reduktion der Proteinexpression auf Wildtyp-Niveau führten.

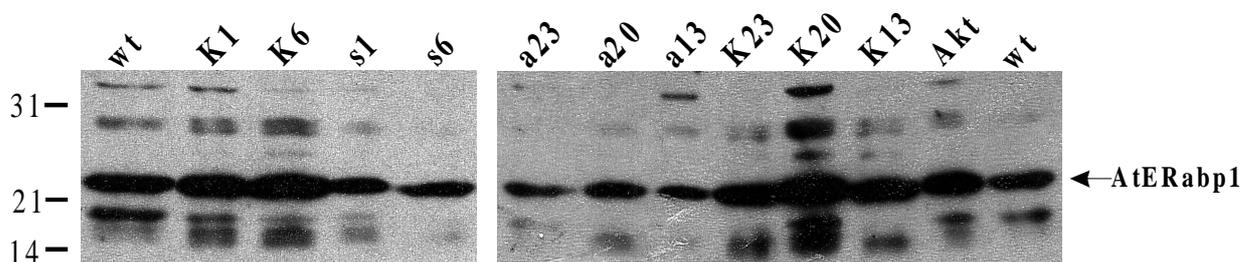


Abb. 10: Western-Blot-Analyse der aktivierten *sense* und *antisense* Pflanzen. Etwa 100 µg mikrosomale Proteine aus Rosettenblättern wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von AtERabp1 erfolgte mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper. wt: Wildtyp; K1: nicht aktivierte *sense*-Linie s1; K6: nicht aktivierte *sense*-Linie s6; s1: aktivierte *sense*-Linie s1; s6: aktivierte *sense*-Linie s6; a13: aktivierte *antisense*-Linie a13; a20: aktivierte *antisense*-Linie a20; a23: aktivierte *antisense*-Linie a23; K23: nicht aktivierte *antisense*-Linie a23; K20: nicht aktivierte *antisense*-Linie a20; K13: nicht aktivierte *antisense*-Linie a13; Akt: Aktivatorlinie.

3.3 Massenspektrometrische Analyse von ZmERabp1

ZmERabp1 ist das einzige Auxin-bindende Protein, das für biochemische Analysen in ausreichenden Mengen aus Maiskoleoptilen isoliert werden kann. Bisher charakterisierte Auxin-bindende Proteine weisen eine hohe Ähnlichkeit (55 %) in ihrer Aminosäuresequenz auf (Anai *et al.*, 1997). Ferner besitzen alle Proteine drei konservierte Cysteinreste. Dies deutet darauf hin, daß alle Auxin-bindenden Proteine eine ähnliche Tertiärstruktur ausbilden, einschließlich der kovalenten Verknüpfung über die Cysteinreste. Somit erlaubt die Analyse von ZmERabp1 Rückschlüsse auf die homologen Proteine.

Es konnte gezeigt werden, daß ZmERabp1 unter nativen Bedingungen als Homodimer vorliegt, jedoch nach nichtreduzierender SDS-Denaturierung als Monomer (Shimomura *et al.*, 1986). In frühen Experimenten zur Auxinbindung wurde nach reduktiver Behandlung von Maismikrosomen eine Abnahme spezifischer NAA-Bindung beobachtet (Ray und Dohrmann, 1977). Daher lag die Vermutung nahe, daß in ZmERabp1 eine intramolekulare Disulfidbrücke vorliegt, die für die Auxinbindung notwendig ist. In einem *epitope-mapping*-Versuch wurde eine Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys3 in NtERabp1 postuliert (Leblanc *et al.*, 1999b). Dabei wurden monoklonale Antikörper gegen Peptide von NtERabp1 eingesetzt, die auf der Proteinprimärsequenz voneinander getrennt liegen. In dem Experiment konnte gezeigt werden, daß einige Anti-Peptidantikörper überlappende Antigenität aufwiesen. Dies wurde als räumliche Nähe der entsprechenden Epitope interpretiert. Um die Frage einer möglichen Disulfidbrücke direkt aufzuklären, sollte ZmERabp1 aus Maikoleoptilen isoliert und massenspektrometrisch analysiert werden.

Bei der Elektrospray-Massenspektrometrie (ES-MS) werden Moleküle schonend ionisiert, gemäß ihrer molekularen Masse getrennt und detektiert. Es erfolgt keine Fragmentierung, und kovalente Bindungen wie Disulfidbrücken bleiben erhalten. Daher eignet sich diese Methode sehr gut zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen und Proteinkomplexen, sofern ihre Verknüpfung kovalent ist. Die Tandem-Massenspektrometrie (Tandem-MS bzw. MS/MS) beruht auf der Hintereinanderschaltung zweier Massenspektrometer. Im ersten Massenspektrometer wird die Probe ionisiert und ergibt ein Massenspektrum. Eine bestimmte Ionensorte kann dann in eine Stoßkammer gelenkt und dort fragmentiert werden. Die Fragment-Ionen werden anschließend im zweiten Massenspektrometer getrennt und detektiert.

Mit dieser Methode können Informationen über die Struktur eines Moleküls gewonnen werden.

3.3.1 Analyse der molekularen Masse von ZmERabp1

ZmERabp1 wurde aus etiolierten Maiskoleoptilen isoliert. Die mikrosomalen Proteine wurden durch Ionenaustauschchromatographie fraktioniert und ZmERabp1 durch Affinitätschromatographie zur Homogenität gereinigt (Abb. 11).

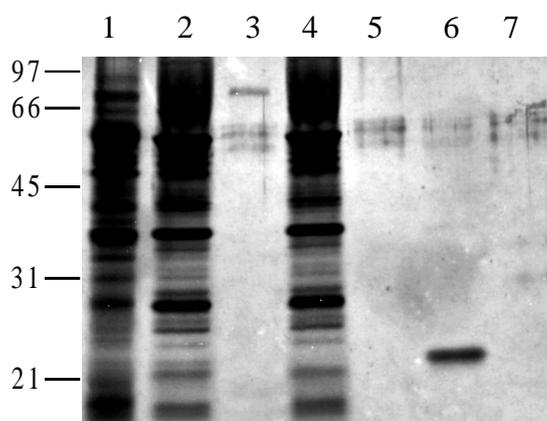


Abb. 11: Isolierung von ZmERabp1 aus Maiskoleoptilen. 1: mikrosomale Proteine; 2: DEAE-Elutionsfraktion; 3: DEAE-Durchflußfraktion; 4: PAA-Durchflußfraktion; 5-7: PAA-Elutionsfraktionen.

ZmERabp1 wurde mittels ES-MS analysiert. Es wurden mehrfachgeladene Molekülionen detektiert ($[M+10H]^{10+}$ bis $[M+15H]^{15+}$) und zur Berechnung der molekularen Masse des Proteins verwendet (Abb. 12). Die Masse beträgt 20243 Da.

Aus früheren Analysen ist bekannt, daß ZmERabp1 glykosyliert ist, und daß der Zuckerrest sehr wahrscheinlich dem mannosereichen Typ entspricht (Hesse *et al.*, 1989). Dies wurde aus dem Verhältnis der identifizierten Monosaccharide (2 Glukosaminreste, 9 Mannosereste) postuliert. Die Masse des Glykanrests wurde durch Subtraktion der aus der Sequenz von ZmERabp1 berechneten Masse der Polypeptidkette von der experimentell bestimmten Masse ermittelt. Bei dieser Berechnung konnte entweder die Masse der reduzierten Form des Proteins (alle Cystinreste liegen als Sulfhydryle vor, 18379,86 Da) oder die Masse der

oxidierten Form des Proteins (eine intramolekulare Disulfidbrücke 18377, 84 Da) verwendet werden. Unter Verwendung der Disulfid-Form von ZmERabp1 betrug die berechnete Masse des Glykanrestes 1865,16 Da, bei Verwendung der reduzierten Form 1863,14 Da. Die theoretisch berechnete Masse für den mannosereichen Glykanrest betrug 1865,67 Da. Die Abweichung von diesem Wert ist bei der Verwendung der oxidierten Form von ZmERabp1 geringer. Daher impliziert bereits die Bestimmung der molekularen Masse von ZmERabp1 das Vorhandensein einer Disulfidbrücke.

Ferner wurden fünf weitere signifikante Molekülspezies zwischen 19400 und 20100 Da detektiert. Diese Signale wiesen auf die Gegenwart mehrerer Glykoformen von ZmERabp1 hin, bei denen ein oder mehrere Mannosereste fehlten ($\Delta 162 = \text{Mannose}$). Das Phänomen unterschiedlicher Glykoformen wurde auch bei anderen Glykoproteinen wie z.B. Ribonuklease B beobachtet (Burlingame, 1993).

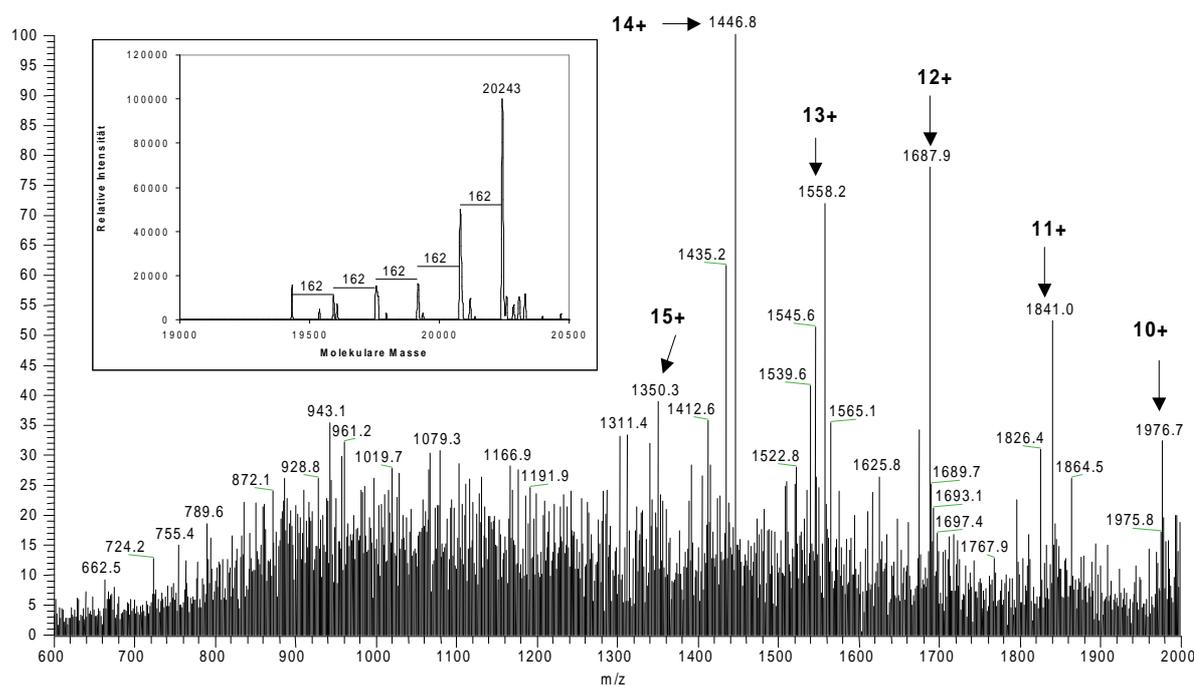


Abb. 12: Massenspektrometrische Analyse von ZmERabp1. Über den Massenzahlen der Molekülionen sind ihre Ladungszahlen angegeben. Das Fenster zeigt die berechnete molekulare Masse von ZmERabp1. Neben dem vollständig glykosylierten Protein wurden verschiedene Glykoformen detektiert, die sich vom mannosereichen Typ durch das Fehlen ein oder mehrerer Mannosereste unterscheiden ($\Delta 162 \text{ Da}$).

3.3.2 Analyse der Disulfidstruktur von ZmERabp1

Zur Lokalisierung der postulierten Disulfidbrücke in ZmERabp1 wurden zwei Experimente durchgeführt. Für die im Protein vorhandenen drei Cysteinreste (Cys2, Cys61 und Cys155) gibt es neben der völlig reduzierten Form drei intramolekulare Verknüpfungsmöglichkeiten; jeweils ein Cystein liegt dabei in reduzierter Form vor. Im ersten Experiment sollte zuerst das freie Cystein mit einem für Sulfhydrylgruppen spezifischen Agens chemisch markiert werden. Nach reduktiver Spaltung der postulierten Disulfidbrücke sollten die entstandenen Sulfhydryle analog mit einem zweiten Agens umgesetzt und das Protein tryptisch verdaut werden. Im zweiten Experiment sollte ZmERabp1 direkt tryptisch verdaut und die über die Disulfidbrücke verknüpften Peptide identifiziert werden.

3.3.2.1 Lokalisierung einer Disulfidbrücke durch spezifische Derivatisierung

Zuerst wurde das Protein mit 4-Vinylpyridin umgesetzt. Dadurch wurden alle freien Cysteinreste derivatisiert. Nach Spaltung der Disulfidbrücke mit β -Mercaptoethanol wurde die Proteinlösung mit Iodacetamid versetzt, um die an einer Disulfidbrücke beteiligten Cysteine zu carboxymethylieren. Anschließend wurde tryptisch verdaut, das Peptidgemisch über HPLC fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert (Abb. 13). Die Identität der Peptide wurde durch Vergleich der detektierten Massen mit den aus der Primärsequenz von ZmERabp1 abgeleiteten theoretischen Werten bestimmt (Tab. 1). In allen Untersuchungen konnte keine Spaltung zwischen den theoretischen tryptischen Peptiden T11 und T12 detektiert werden. Diese Peptide traten somit immer als T11/12-Fragment auf (Tab. 1). Die massenspektrometrische Analyse zeigte, daß das tryptische Fragment T11/12 den 4-Vinylpyridinrest trug, erkennbar an der Massendifferenz von 105 Da. Dies bedeutet, daß Cys155 das einzige Peptid mit einer freien Sulfhydrylgruppe in ZmERabp1 war. Bestätigt wurde das Ergebnis durch die Identifizierung der Carboxymethylierung der Peptide T1 und T6, die beide eine Massendifferenz von 57 Da aufwiesen (Tab. 1). Alle weiteren tryptischen Peptide konnten detektiert werden, mit Ausnahme von T7, dessen HPLC-Retentionszeit zu gering war (s. Anhang).

Peptide	Sequenz	[M+H] ⁺ theor.	[M+H] ⁺ det.	RT [min]	Bemerkungen
T1	SCVR	464,57	521,3	2.01-2.24	Markiert mit Iodacetamid (Δ 57)
T2	DNSLVR	703,77	703,4	13.7-13.84	
T3	DISQMPQSSYGIEGLSHITVAGALNHGMK	3043,45	3042,7	40.42-40.56	
T4	EVEVWLQTISPGQR	1642,85	1641,8	37.36-37.56	
T5	TPHR	623,73	623,5	8.68-8.91	
T6	HSCEEVFTVLK	1292,50	1348,6	33.19-33.33	Markiert mit Iodacetamid (Δ 57)
T7	GK	204,25	—	—	Dipeptid, zu klein zur Detektion
T8	GTLIMGSSSLK	1094,32	1093,5	30.23-30.33	
T9	YPGQPQEIPFFQNTTFSIPVNDPHQVWNSDEHE DLQVLVIIRPPAK	5431,04	—	—	Mannosereicher Typ (GlcNAc ₂ Man ₉)
T9-Glyc		7297,71	7296,6	45.92-46.09	
T10	IFLYDDWSMPHTAAVLK	2008,35	2007,6	42.14-42.29	
T11/12	FPFVWDEDCFEAAKDEL	2062,29	2168,2	43.49-44.10	Markiert mit 4-Vinylpyridin (Δ 105)

Tab. 1: LC/ES-MS Analyse der tryptischen Peptide von ZmERabp1. Natives ZmERabp1 wurde mit 4-Vinylpyridin alkyliert, nach Reduktion mit Iodacetamid derivatisiert und tryptisch verdaut. Die mittels HPLC getrennten Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert. Zusammengefaßt sind die Bezeichnung der tryptischen Peptide, ihre aus der *Z. mays* Primärsequenz abgeleiteten Sequenzen, die daraus berechneten protonierten Massen [M+H]⁺ theor., die detektierten protonierten Massen [M+H]⁺ det. sowie deren HPLC-Retentionszeiten RT.

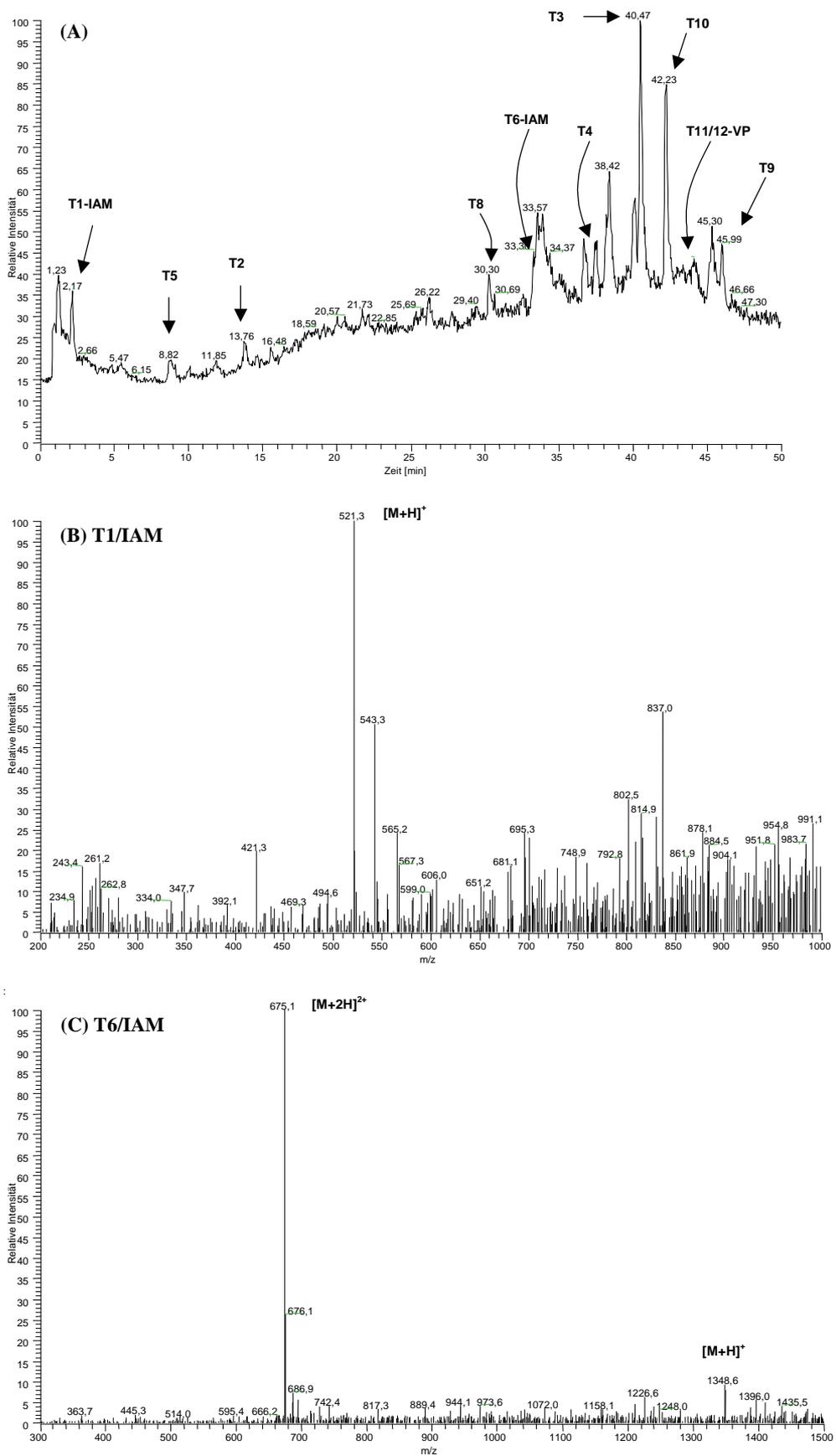


Abb. 13: Legende s. nächste Seite

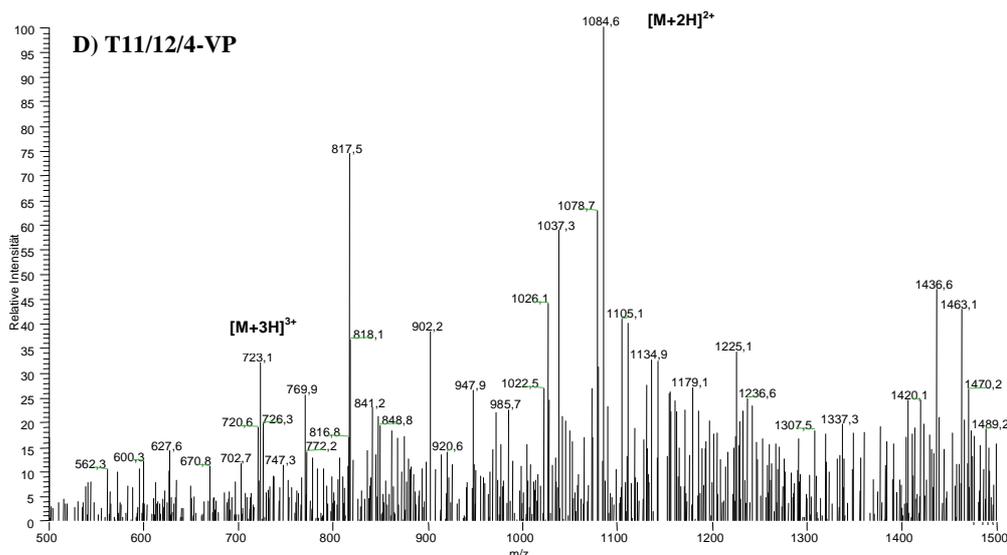


Abb. 13: Massenspektrometrische Analyse eines tryptischen Verdau von derivatisiertem (4-Vinylpyridin/Iodacetamid) ZmERabp1. A: Chromatographische Spur als Totalionenstrom (TIC); B-D: Massenspektren der derivatisierten Peptide T1/Iodacetamid, T6/Iodacetamid bzw. T11/12/4-Vinylpyridin.

3.3.2.2 Direkter Nachweis einer Disulfidbrücke

Um die Lokalisierung der Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys61 direkt nachzuweisen, wurde das isolierte ZmERabp1 direkt einem tryptischen Verdau unterzogen und massenspektrometrisch untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß die tryptischen Fragmente T1 und T6 nicht einzeln, sondern zusammen mit einer Masse von 1753,9 Da detektiert wurden (Abb. 14 A u. Tab. 2). Kein weiteres mögliches Dipeptid, das auf eine andere Disulfidbrücke hinweisen würde (T1/T11/12, T6/T11/12), wurde detektiert. Es wurden weder das Fragment T11/12 noch die Einzelpeptide detektiert.

In einem MS/MS-Experiment wurden die verknüpften Peptide T1 und T6 genauer untersucht (Abb. 14 B u. Tab. 3). Mittels Fragmentanalyse konnte die Sequenz ermittelt werden. Ferner wurde die Verknüpfungsart der beiden Peptide über eine Thioetherbindung und somit die Disulfidbrücke eindeutig durch die charakteristischen Ionenpaare 430,3/1323,7 sowie 1258,6/496,4 bewiesen.

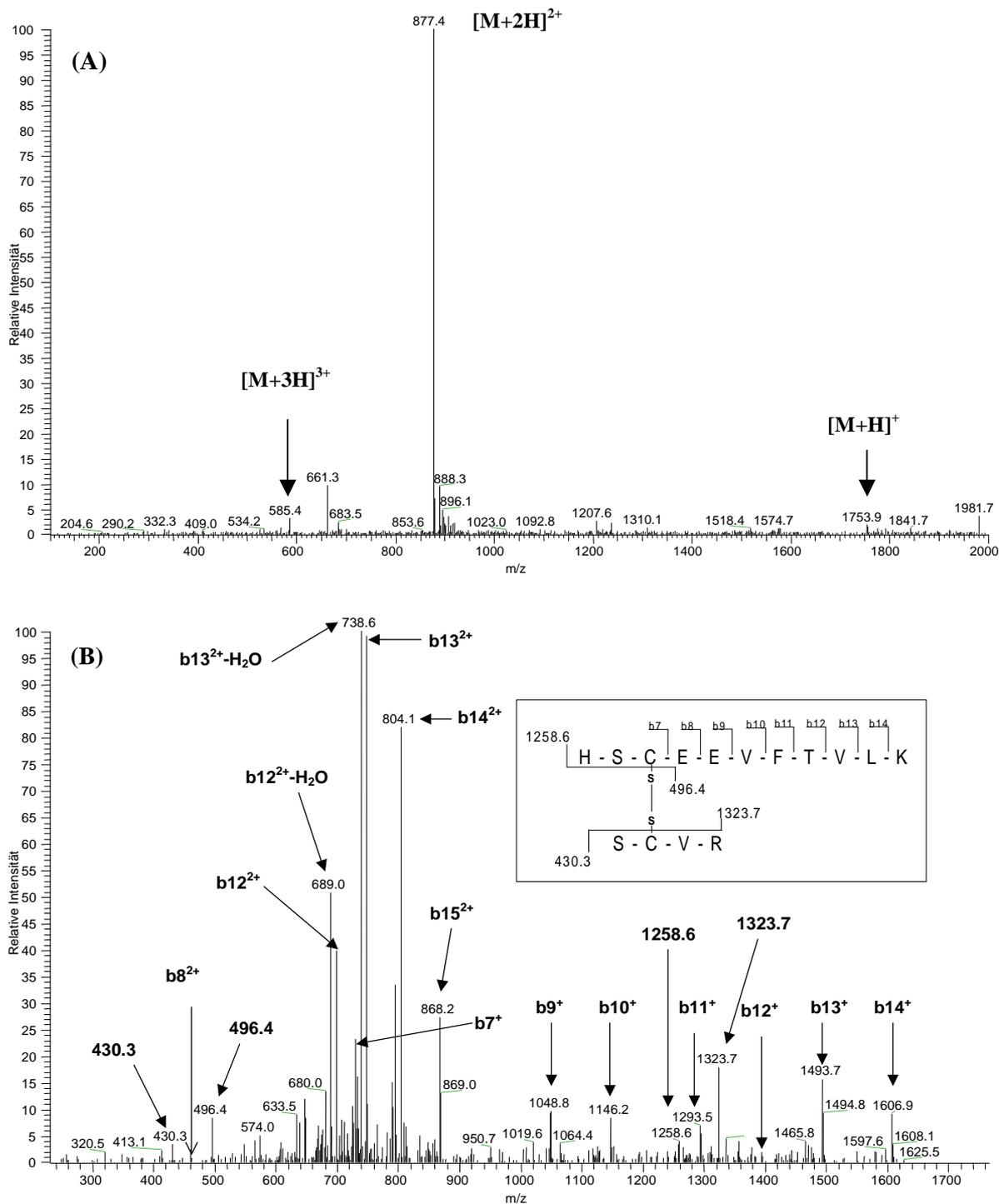


Abb. 14: Analyse der disulfidverbückten Peptide T1/T6. A:Molekülienspektrum von T1/T6; B:Tandem-Massenspektrum von T1/T6; das Fenster zeigt die schematische Fragmentierung des Moleküls.

Peptide	[M+H] ⁺ theor.	[M+H] ⁺ det.	RT [min]	Bemerkungen
T1/T6	1754,07	1753,9	22,02-22,11	T1 verknüpft mit T6 über Disulfidbrücke
T2	703,77	703,5	9,63-9,98	—
T3	3043,45	3043,4	31,57-31,83	—
T4	1642,85	1641,9	28,71-29,06	—
T5	623,73	623,4	4,71-4,97	—
T7	204,25	—	—	Dipeptid, zu kein zur Detektion
T8	1094,32	1093,6	22,21-23,08	—
T9	7297,71	7295,4	37,79-37,88	Mannosereicher Typ (GlcNAc ₂ Man ₉)
T10	2008,35	2007,8	—	—
T11	1704,90	—	—	Nicht det.
T12	376,39	—	—	Nicht det.

Tab. 2: Identifizierung der tryptischen Fragmente von ZmERabp1. Natives ZmERabp1 wurde mit Trypsin verdaut, über HPLC getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

Die Resultate der Fragmentanalyse belegten die Existenz einer intramolekularen Disulfidbrücke in ZmERabp1 zwischen Cys2 und Cys61 (Abb. 15).

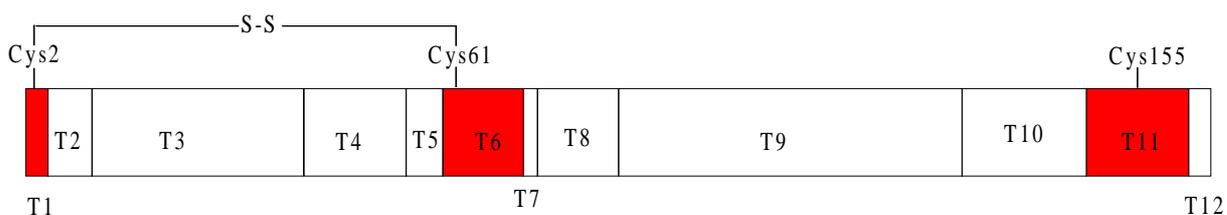


Abb. 15: Schematische Darstellung der Disulfidstruktur von ZmERabp1. Die Rechtecke stellen maßstabgerecht die tryptischen Fragmente dar. Die Peptide mit Cysteinresten sind rot unterlegt.

Sequenz		$[M+H]^+ / [M+2H]^{2+}$ theor.	$[M+H]^+ / [M+2H]^{2+}$ det.
SCVR HSCEEVFTVLK	T1/T6	1754.0 877.5	1753.9 877.4
SCVR HSCEEVFTVLK	b_{15} b_{15}^{2+}	1736.0 868.5	n.d. 868.2
SCVR HSCEEVFTVL	b_{14} b_{14}^{2+}	1607.9 804.4	1606.9 804.1
SCVR HSCEEVFTV	b_{13} b_{13}^{2+}	1494.7 747.9	1493.7 747.6
SCVR HSCEEVFT	b_{12} b_{12}^{2+}	1395.6 698.3	1394.4 698.0
SCVR HSCEEVF	b_{11} b_{11}^{2+}	1294.5 647.7	1293.5 647.9
SCVR HSCEEV	b_{10} b_{10}^{2+}	1147.3 574.1	1146.2 574.0
SCVR HSCEE	b_9 b_9^{2+}	1048.1 524.6	1048.8 n.d.
SCVR HSCE	b_8 b_8^{2+}	919.0 460.0	919.3 460.4
SCVR HSC	b_7 b_7^{2+}	789.9 395.5	789.9 n.d.
SCVR (- H ₂ S)		430.5	430.3
SCVR SSH		496.6	496.4
HSCEEVFTVLK (- H ₂ S)		1257.5	1258.6
SSH HSCEEVFTVLK		1322.6	1323.7

Tab. 3: MS/MS-Analyse der über eine Disulfidbrücke verbundenen Peptide T1/T6. Aufgeführt ist die b-Fragmentierungsserie sowie die Spaltung der Disulfidbrücke von T1/T6.

3.4 Renaturierung von AtERabp1

Die für biochemische Analysen benötigten Proteinmengen sind viel größer, als die Mengen, die sich aus Pflanzen von *A. thaliana* in einem sinnvollen Maßstab isolieren lassen. Daher sollte AtERabp1 in *E. coli* rekombinant exprimiert, isoliert und renaturiert werden.

3.4.1 Expression und Reinigung

Die *AtERabp1*-cDNA wurde in den Expressionsvektor pET28a unter der Kontrolle des T7-Promotors kloniert. Zur leichteren Reinigung über Ni-NTA-Agarose wurde das Protein mit einer N-terminalen Fusion von sechs Histidinresten exprimiert. Für die angestrebten Untersuchungen wurden mehrere Milligramm des Proteins benötigt. Aus 4 l Bakterienkultur wurden nach IPTG-Induktion die *inclusion bodies* isoliert, denaturierend gelöst und zur Trennung von bakteriellen Verunreinigungen sowie von DTT auf einer Sephadex G-25-Säule in einen anderen Puffer überführt. Die Affinitätsreinigung des Proteins erfolgte auf einer Ni-NTA-Säule. Schließlich wurde zur Vorbereitung der Renaturierung erneut auf einer Sephadex G-25-Säule der Puffer gewechselt. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 16). Die Ausbeute betrug etwa 300 mg rekombinantes Protein.

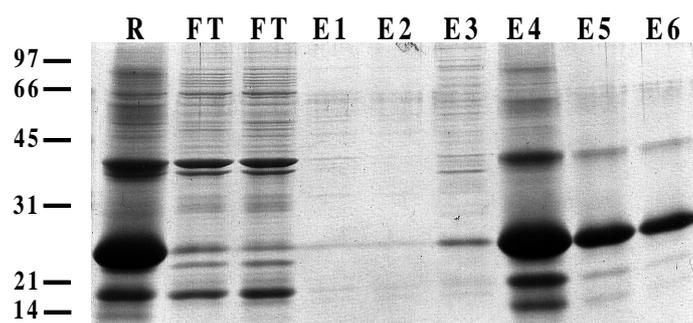


Abb. 16: Isolierung von AtERabp1 aus *E. coli* und Reinigung an Ni-NTA-Agarose. Coomassie-Färbung eines SDS-Gels. R: Rohextrakt; FT: Durchfluß; E1-E6: Elutionsfraktionen.

3.4.2 Renaturierung

Nach der Isolierung lag das rekombinante Protein in 6 M Guanidiniumhydrochlorid vor und sollte für weitere funktionelle Analysen in seine native Konformation überführt werden. Eine einfache und effiziente Methode ist das rasche Verdünnen der Proteinlösung in ein großes Volumen. Dabei wird einerseits das eingesetzte Agens unter seine denaturierend wirkende Konzentration verdünnt. Andererseits wird die Proteinkonzentration stark verringert, so daß die Aggregation von Rückfaltungsintermediaten minimiert wird. Die Zusammensetzung des Puffers einschließlich des Redoxpotentials wurde empirisch evaluiert. Dazu wurden mehrere Renaturierungen in kleinen Volumina durchgeführt und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Verwendet wurde schließlich ein reduzierender basischer Puffer mit Arginin und Glutathion. Um auszuschließen, daß Mikroaggregate die nachfolgenden Analysen stören, schloß sich nach der Konzentration der Probe ein Ultrazentrifugationsschritt an. Über SDS-PAGE wurde überprüft, ob ein ausreichender Teil des rückgefalteten Proteins unter denaturierenden aber nicht reduzierenden Bedingungen als Monomer vorlag (Abb. 17). Der Vergleich von reduzierter und nichtreduzierter Probe zeigte, daß etwa 50 % des vorhandenen Proteins als Monomer vorlagen.

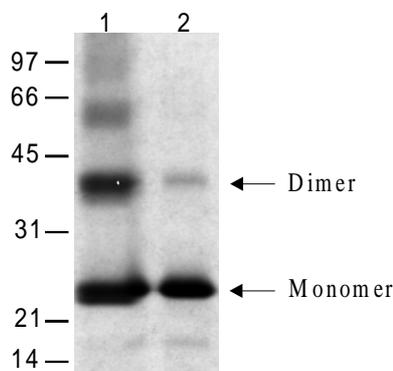


Abb. 17: Überprüfung der Renaturierung. Jeweils 5 μ g renaturiertes AtERabp1 wurde einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung unterzogen. Dabei wurde eine Probe mit Puffer ohne Reduktionsmittel (1), die andere mit reduzierendem Probenpuffer (2) versetzt.

3.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Das Fluoreszenzspektrum eines Proteins wird hauptsächlich durch die Fluoreszenz der Tryptophanreste bestimmt. Dabei beeinflusst die direkte räumliche Umgebung des Fluorophors die Lage und Intensität des Fluoreszenzmaximums. Je hydrophober die Umgebung des Tryptophanrestes ist, desto stärker ist das Emissionsmaximum ins kurzwellige Blaulicht verschoben; umgekehrt verschiebt es sich in polarer Umgebung zu größeren Wellenlängen. Messungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz geben daher Aufschluß darüber, ob ein Protein denaturiert vorliegt oder ob sich bereits regelmäßige Strukturen ausgebildet haben. Im ersten Fall liegt das Fluoreszenzmaximum bei 350 nm, während natives Protein in der Regel ein Maximum um 330 nm oder darunter besitzt (Eftink, 1997). Daher stellt die Fluoreszenzspektroskopie eine schnelle und effiziente Methode zur Überprüfung der Renaturierungsschritte dar. Ferner ist die Fluoreszenzspektroskopie eine häufig angewandte Methode zur Analyse sowohl von Protein-Protein- als auch von Protein-Ligand-Wechselwirkungen (Phizicky und Fields, 1995). Zur weiteren Charakterisierung des renaturierten AtERabp1 sollten Titrationen mit Auxin durchgeführt und die Dissoziationskonstante des Protein-Ligand-Komplexes bestimmt werden.

3.4.3.1 Überprüfung der Renaturierung

Direkt nach der Renaturierung wurden Messungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz vorgenommen. Es wurden sowohl die Emissionsspektren von renaturiertem AtERabp1 als auch von anschließend wieder mit Guanidiniumhydrochlorid denaturiertem AtERabp1 aufgenommen (Abb. 18). Die Spektren zeigten eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 330 nm (renaturiertes Protein) zu 350 nm (denaturiertes Protein). Außerdem wies die denaturierte Proteinprobe eine geringere Fluoreszenzintensität auf.

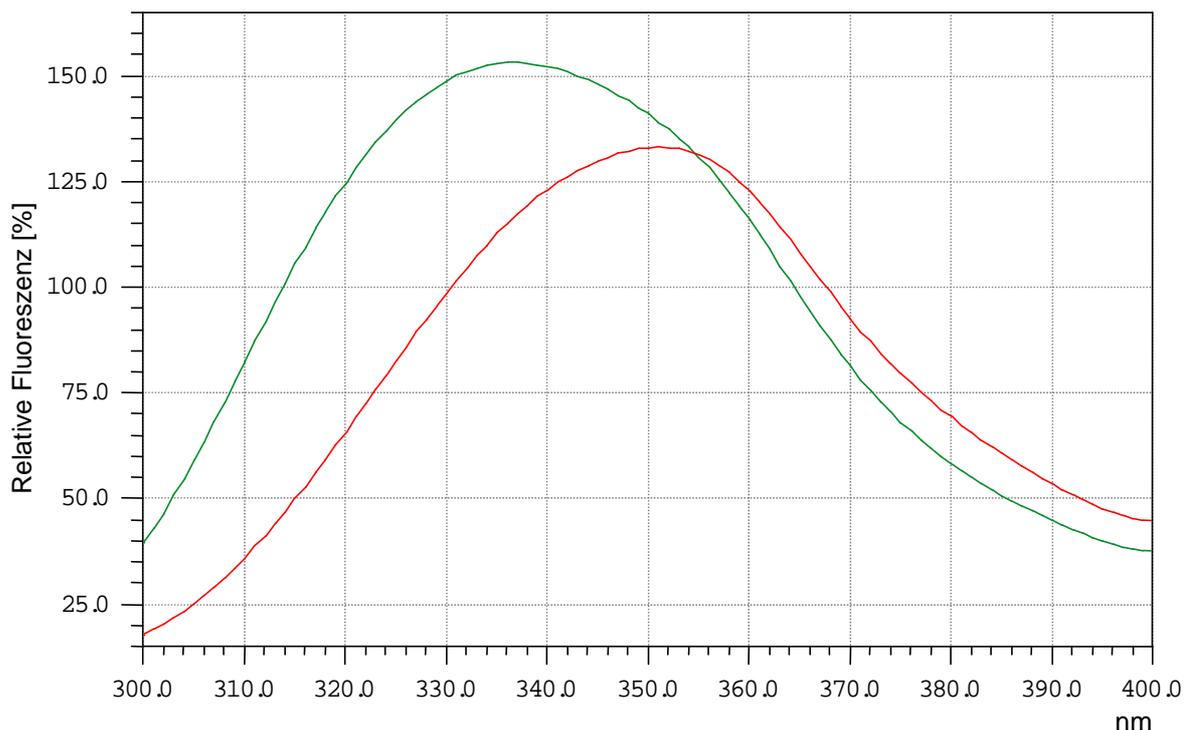


Abb. 18: Fluoreszenzspektren von renaturiertem (grün) sowie von denaturiertem (rot) AtERabp1. Die Anregung erfolgte bei 285 nm, und die Emission wurde zwischen 300 und 400 nm aufgezeichnet.

3.4.3.2 Ligamentitration

Ferner wurden Ligamentitrationen durchgeführt, um eine spezifische Bindung an das renaturierte Protein zu überprüfen. Die Bindung eines Liganden an ein Protein zeigt sich in der Intensitätsänderung des Fluoreszenzmaximums. Die Bindung von Auxin an ZmERabp1 ist vom pH-Wert abhängig. Das Optimum liegt bei einem pH-Wert von 5,5 (Löbler und Klämbt, 1985). Daher wurde die Proteinlösung auf diesen pH-Wert eingestellt und Titrationskurven aufgenommen. Dabei wurde durch die Wahl des Puffers darauf geachtet, daß die Zugabe des Liganden den pH-Wert nicht veränderte. In Auxinbindungsstudien wurde gezeigt, daß das synthetische Auxin 1-NAA eine höhere Affinität zu ZmERabp1 besitzt (K_D $2,4 \times 10^{-7}$ M), als die natürlich vorkommende IAA (K_D $1,26 \times 10^{-6}$ M) (Hesse *et al.*, 1989). Außerdem sind die spektroskopischen Eigenschaften von 1-NAA günstiger, da IAA als Tryptophananalogon stärker als 1-NAA die Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Proteins überlagert. Daher wurde 1-NAA bei den folgenden Messungen verwendet. Als Referenz

diente die Titration von 1-NAA in Probenpuffer und wurde aufgrund seiner relativ starken Eigenfluoreszenz vom Proteinfluoreszenzsignal subtrahiert. Sowohl die Proteinkonzentration als auch die Konzentration von 1-NAA lagen im mikromolaren Bereich. Zur Aufnahme einer Titrationskurve wurde die relative Fluoreszenz bei 340 nm gegen die 1-NAA Konzentration aufgetragen (Abb. 19). Die Emission wurde bei 340 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge die Fluoreszenzänderung maximal war. Als Kontrolle wurde die Proteinlösung durch Zugabe von festem Guanidiniumhydrochlorid denaturiert und der Titration unterzogen (Abb. 19). Der Vergleich zeigte bei der renaturierten Probe mit steigender 1-NAA-Konzentration einen abnehmenden Verlauf der Fluoreszenzintensität, während die denaturierte Probe Fluktuationen in der relativen Fluoreszenz aufwies. Ferner war der Wert der relativen Fluoreszenz vor der 1-NAA-Zugabe bei der renaturierten Probe deutlich größer. Dies wies darauf hin, daß zumindest ein Teil des renaturierten AtERabp1 in seiner nativen Konformation vorlag und daher Auxin zu binden vermochte.

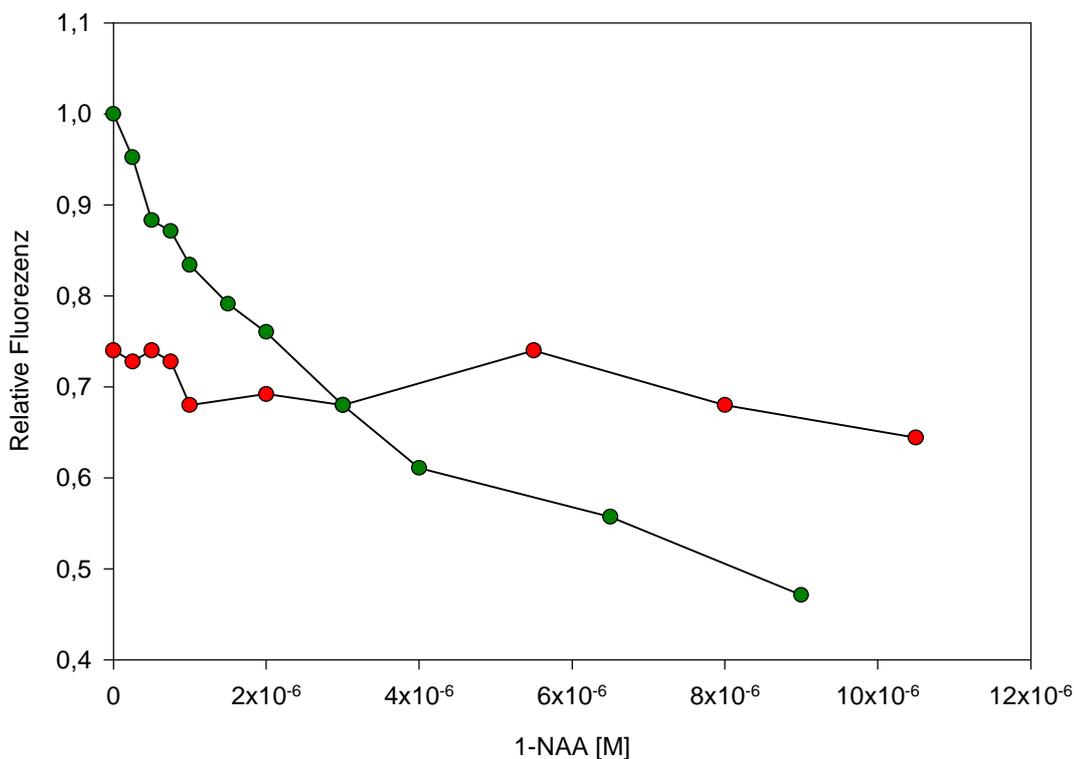


Abb. 19: Titration von renaturiertem (grün) und mit 4 M GdmCl denaturiertem (rot) AtERabp1 mit 1-NAA. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz gegen die NAA-Konzentration nach Pufferkorrektur.

Die in Abbildung Abb. 19 dargestellte Titration mit 1-NAA wurde zur Berechnung der Komplex-Dissoziationskonstanten K_D herangezogen (Abb. 20). Die Titration zeigte eine konvergierende Abnahme der relativen Fluoreszenz. Allerdings wurde die Konzentration von AtERabp1 nur geschätzt, da die Rückfaltungsausbeute nicht bestimmt werden konnte. Die eingesetzte Gesamteprotein-Konzentration betrug $100 \mu\text{g/ml}$. Das funktionell aktive Protein liegt unter SDS-denaturierenden Bedingungen als Monomer vor (Shimomura *et al.*, 1986); dies war für etwa 50 % des renaturierten Proteins der Fall (Abb. 17). Das entsprach einer Proteinkonzentration von etwa $50 \mu\text{g/ml}$, oder 2 nmol/ml bzw. $2 \mu\text{M}$. Die resultierende Dissoziationskonstante von 1-NAA wurde durch nichtlineare Regression mit Hilfe eines Computerprogramms (*Sigma Plot*) berechnet und ergab $2,3 \times 10^{-6} \text{ M}$.

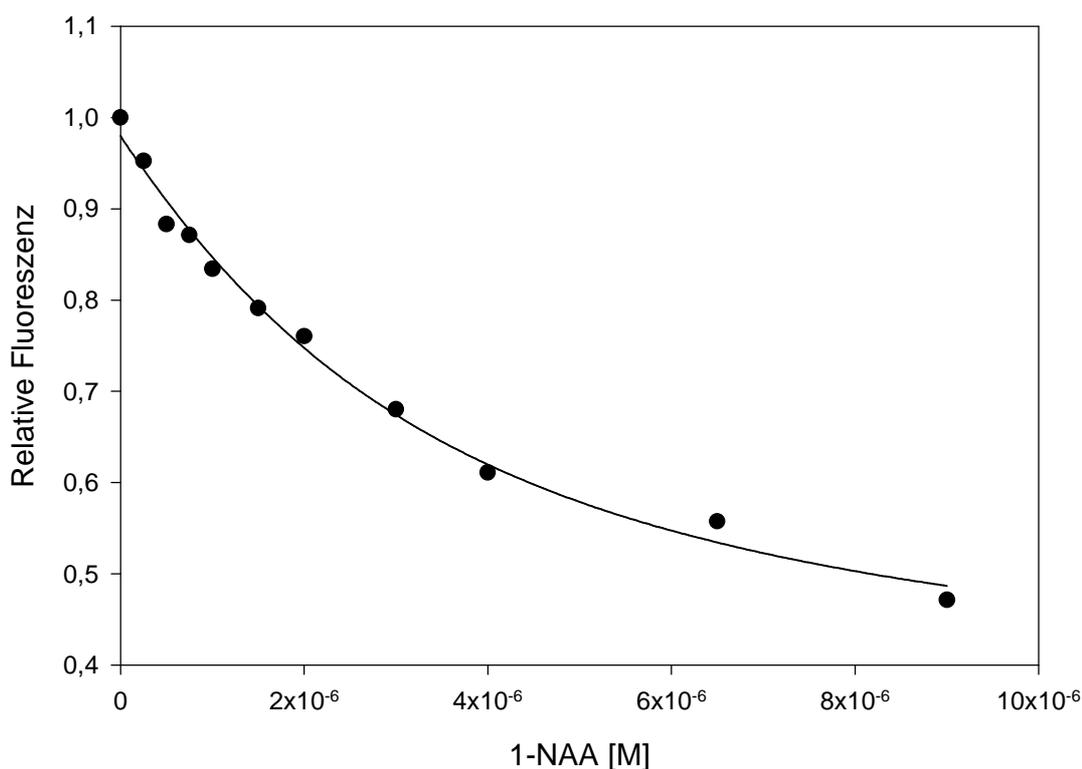


Abb. 20: Titration von renaturiertem AtERabp1 mit 1-NAA zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz bei 340 nm gegen die 1-NAA-Konzentration nach Pufferkorrektur; die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Regression wurde mit *Sigma Plot* durchgeführt.

Die zu 1-NAA isomere 2-NAA besitzt keine physiologische Auxinwirkung. In Bindungsstudien mit isoliertem ZmERabp1 konnte allerdings eine mit 1-NAA kompetitierbare Bindung ermittelt werden (Löbler und Klämbt, 1985; Shimomura *et al.*, 1986; Hesse *et al.*, 1989). Die Titration von 2-NAA zu renaturiertem AtERabp1 zeigte eine konvergierende Abnahme der relativen Fluoreszenz (Abb. 21). Durch nichtlineare Regression (*Sigma Plot*) konnte für die 2-NAA-Bindung an AtERabp1 die Dissoziationskonstante berechnet werden. Es ergab sich ein K_D -Wert von $3,6 \times 10^{-7}$ M.

Die Titrationsexperimente gaben klare Hinweise darauf, daß zumindest ein Teil des renaturierten AtERabp1 in seiner nativen Konformation vorlag und eine spezifische Auxinbindeaktivität aufwies.

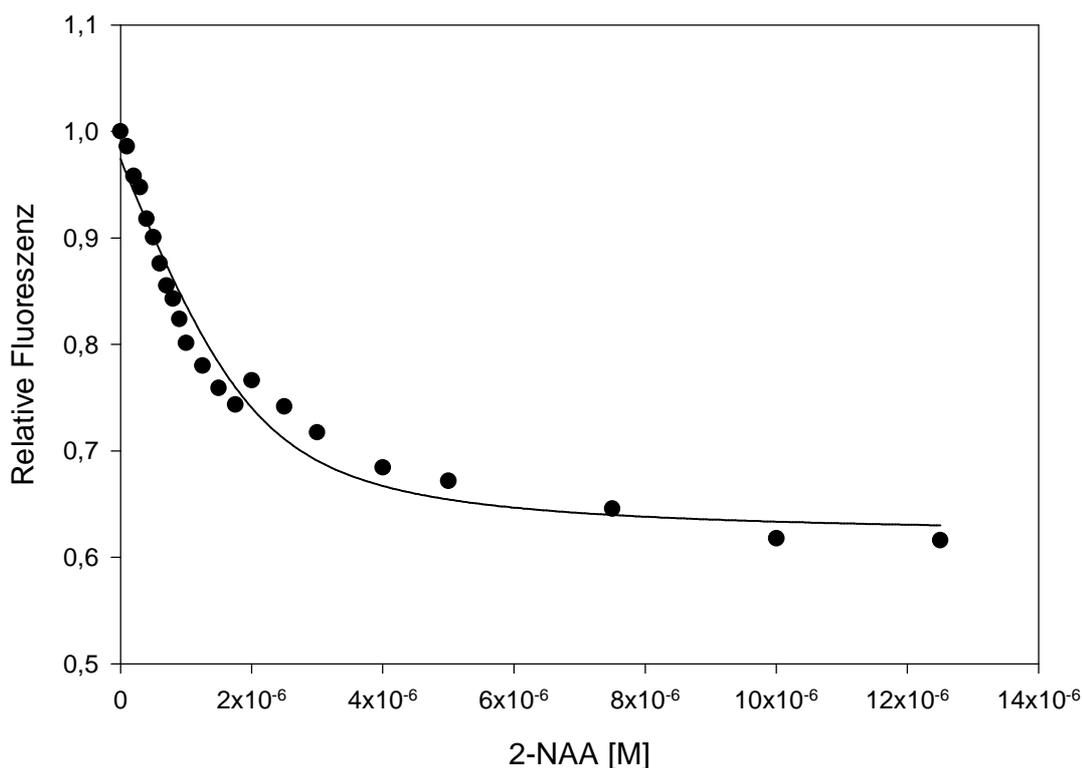


Abb. 21: Titration von renaturiertem AtERabp1 mit 2-NAA zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz bei 340 nm gegen die 2-NAA-Konzentration nach Pufferkorrektur; die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Regression wurde mit *Sigma Plot* durchgeführt.

3.5 Funktionelle Untersuchungen von ZmERabp1

Das Auxin-induzierte Wachstum beginnt beim klassischen *Avena*-Koleoptilenstreckungsversuch mit einer 8- bis 10minütigen Verzögerung nach Auxinapplikation (Davies, 1995). Nach der *Acid Growth Theorie* bewirkt das Auxinsignal eine Absenkung des pH-Werts im Apoplasten, einhergehend mit einer Plastizitätssteigerung der Zellwand (Übersicht s. Kutschera, 1994). Durch Aufnahme von Kaliumionen wird der Turgor erhöht, so daß Zellwachstum stattfinden kann. Zur Untersuchung der primären Auxinantwort wurde ein System gesucht, in dem Antikörper und Peptide eingesetzt werden können; Stoffe mit einer molekularen Masse größer als 100 kDa können die Zellwand nicht passieren (Baron-Epel et al., 1988). Nach Zugabe von Auxin zu Maisprotoplasten beginnen diese zu schwellen. Analog des Auxin-induzierten Streckungswachstums bei der Koleoptile hängt die Volumenänderung der Protoplasten mit einer Kaliumionenaufnahme zusammen (Keller und Van Volkenburgh, 1996). Deshalb liegt es nahe, den Mechanismus des Zellstreckungswachstums auf die Ergebnisse aus der Analyse des Protoplastensystems zu übertragen. Es ist gelungen, die Volumenzunahme von Maisprotoplasten nach Auxinapplikation zu messen (Steffens und Lüthen, 2000). Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ABP1 aus *A. thaliana* und einem Peptid, abgeleitet aus der Primärsequenz von *Z. mays*, sollte überprüft werden, ob die Funktionsanalyse von ABP1 in diesem System möglich ist.

3.5.1 Auxininduktionsstudien mit Protoplasten

Zunächst sollte gezeigt werden, inwieweit die Auxin-induzierte Volumenzunahme von Maisprotoplasten mit dem Streckungswachstum der Maiskoleoptile zeitlich korreliert.

Indolessigsäure (IAA) wurde in einer Konzentration von 10^{-6} M zu Maisprotoplasten gegeben. Nach einer anfänglichen Volumenverringerung des Protoplasten um 3 % (Minimum fünf Minuten nach Zugabe von IAA) erfolgte eine Volumenvergrößerung um 3 % (Maximum 25 Minuten nach IAA-Zugabe) (Abb. 22). Vergleicht man diese Schwellantwort des Protoplasten mit dem Streckungswachstum einer Maiskoleoptile, so kann eine zeitliche Korrelation in den ersten 25 Minuten nach Auxininduktion festgestellt werden (Steffens und Lüthen, 2000). Nach etwa 15 Minuten hatte der Protoplast seine ursprüngliche Größe wieder

erreicht und zeigte danach Netto-„Wachstum“. Genau zu diesem Zeitpunkt begann auch das Streckungswachstum der Koleoptile (Steffens und Lüthen, 2000). Dieses Experiment verdeutlicht die Analogie von Auxin-induzierter Volumenzunahme von Maisprotoplasten und dem Streckungswachstum von Maiskoleoptilen in dem gewählten Zeitraum. Daher war es sinnvoll, das für Peptide und Antikörper leicht zugängliche Protoplastensystem für funktionelle Untersuchungen der frühen Auxinantwort zu nutzen.

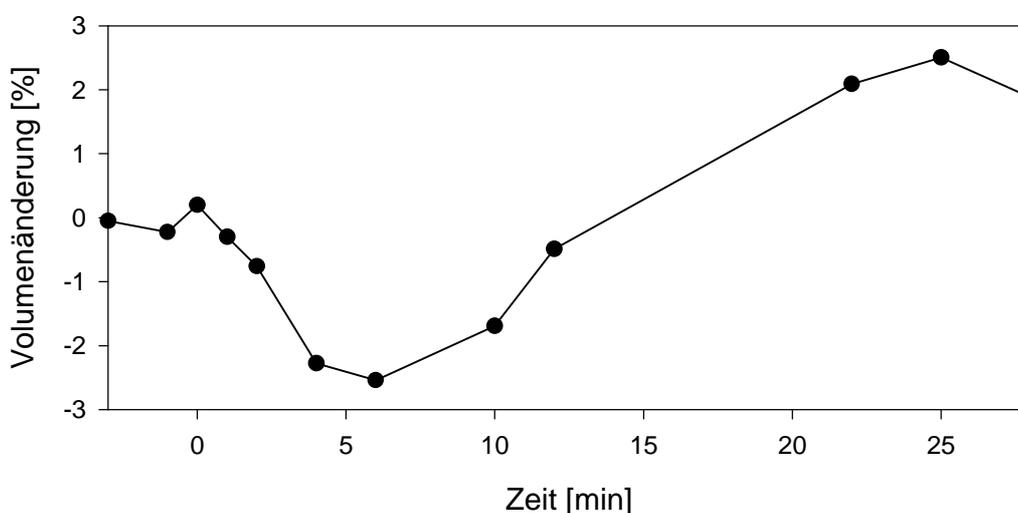


Abb. 22: IAA-induzierten Volumenänderung eines Maisprotoplasten. Die Volumenänderung des Protoplasten wurde vor und nach der Zugabe von 10^{-6} M IAA bei $t = 0$ beobachtet.

3.5.2 Anti-AtERabp1-Peptidantikörper

Der in dieser Arbeit hergestellte anti-AtERabp1-Peptidantikörper war gegen eine Aminosäuresequenz von AtERabp1 gerichtet, die in allen Auxin-bindenden Proteinen hochkonserviert ist (Box A). Daher war zu erwarten, daß der Antikörper ZmERabp1 zu detektieren vermag. Dies wurde mittels Western-Blot-Analyse von mikrosomalen Proteinen aus Koleoptilen von *Z. mays* überprüft (Abb. 23). Der Antikörper zeigte eine spezifische Immunreaktion mit einem Protein bei einer apparenten molekularen Masse von 24 kDa, die mit dem Antigen kompetitiert werden konnte.

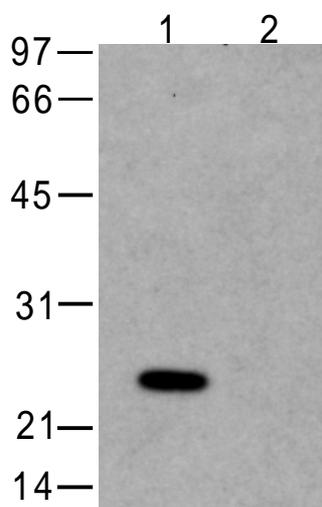


Abb. 23: Western-Blot-Analyse mit Kompetitionskontrolle. Mikrosomale Proteine aus Maiskoleoptilen wurden über SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde geteilt und mit anti-AtERabp1-Peptidantikörper (1) bzw. Antikörper und Antigen (2) inkubiert.

Elektrophysiologische Untersuchungen von Tabakprotoplasten haben gezeigt, daß Antikörper, die gegen Box A von ZmERabp1 gerichtet sind, Auxinaktivität besitzen (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989; Leblanc *et al.*, 1999b). Da mit dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper ein analoger Antikörper zu Verfügung stand, sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Zugabe des Antikörpers auf die Maisprotoplasten ausübte.

Unmittelbar nach Zugabe des Antikörpers erfolgte eine Volumenverringerng, die 5 bis 10 Minuten anhielt und danach in eine Volumenzunahme des Protoplasten umschlug (Abb. 22). Der Vergleich mit der Auxin-induzierten Antwort zeigte ein ähnliches Verhalten der Protoplasten. Allerdings war die Antikörper-induzierte Volumenzunahme langsamer und am Ende der Messung nach 100 Minuten noch nicht abgeschlossen. Da der Antikörper in PBS vorlag, wurde ein Kontrollexperiment mit PBS durchgeführt. PBS induzierte keine signifikante Änderung des Volumens. Um die Spezifität des Antikörpers *in vivo* zu demonstrieren, sollte seine Auxin-ähnliche Wirkung durch Zugabe seines Antigens kompetitiert werden. Der Antikörper wurde mit einem Überschuß des Peptids präinkubiert und anschließend zu den Protoplasten gegeben. Es wurde gezeigt, daß die charakteristische Volumenänderung vollständig unterdrückt wird.

Ferner wurde ermittelt, welche Antikörperkonzentration die größte Wirkung in dem verwendeten System ausübte. Dazu wurden Maisprotoplasten mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers inkubiert und die Änderung des Nettovolumens 90 Minuten nach Zugabe gemessen (Abb. 24 B). Der größte Effekt wurde bei einer Konzentration von 10^{-8} M beobachtet.

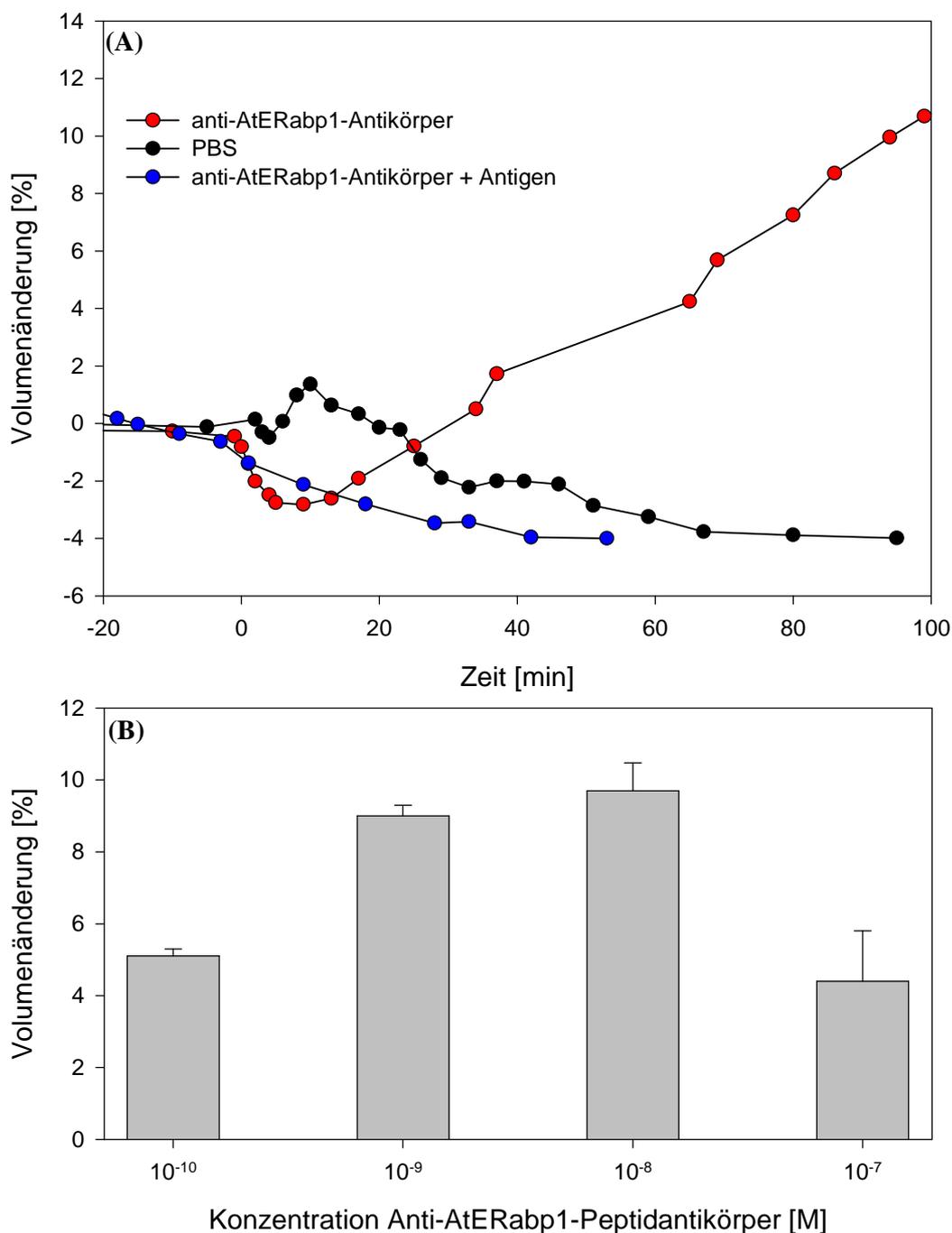


Abb. 24: Einfluß des anti-AtERabp1-Peptidantikörpers auf die Volumenänderung von Maisprotoplasten. (A) Volumenänderung eines Maisprotoplasten nach Zugabe von 10^{-8} M anti-AtERabp1-Peptidantikörper (rot), PBS (schwarz) bzw. 10^{-8} M anti-AtERabp1-Peptidantikörper präinkubiert mit 10^{-6} M Antigen (blau). Die Zugabe erfolgte bei $t = 0$ min. (B) Konzentrationsabhängigkeit der Antikörper-induzierten Volumenzunahme. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4-10 Messungen pro Antikörperkonzentration.

3.5.3 Anti-C-Terminus-Antikörper

Ein weiterer in dieser Arbeit affinitätsgereinigter Antikörper sollte auf seine Funktionalität im Maisprotoplastensystem untersucht werden. Die Herstellung erfolgte analog dem anti-AtERabp1-Peptidantikörper. Der Antikörper war gegen ein C-terminales Peptid gerichtet, das aus der Aminosäuresequenz von *A. thaliana* abgeleitet wurde (Abb. 25). Die Ähnlichkeit des Peptids zur ZmERabp1-Sequenz beträgt nur 50 %. In Western-Blot-Analysen von Maismikrosomen konnte mit dem Antikörper kein Signal detektiert werden. Allerdings detektierte der Antikörper das als Ubiquitin-Fusionsprotein rekombinant exprimierte ZmERabp1 mit einer aus der Primärsequenz berechneten Masse von 28 kDa (Abb. 26). Diese Immunreaktion konnte mit einem C-terminalen Peptid (T11/12) aus *Z. mays* kompetitiert werden.

<i>A. thaliana</i>	YWDEQCIQESQK
<i>Z. mays</i>	VWDED CF EAAK

Abb. 25: *A. thaliana* Peptidsequenz, die zur Herstellung des anti-C-Terminus-Antikörpers verwendet wurde. Im Vergleich wurde die entsprechende Peptidsequenz aus *Z. mays* abgebildet.

In elektrophysiologischen Studien vermochten Antikörper, die gegen das gesamte Protein gerichtet waren, die Auxin-induzierte Hyperpolarisation des Transmembranpotentials zu inhibieren (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989). Daher sollte untersucht werden, ob der anti-C-Terminus-Antikörper einen Einfluß auf die Auxin-induzierte Volumenzunahme ausüben vermag. Die Protoplasten wurden vor Auxinzugabe mit anti-C-Terminus-Antikörper präinkubiert. Das Ergebnis zeigte, daß die charakteristische Auxin-induzierte Volumenänderung inhibiert wurde (Abb. 27). Die Volumenverringerng, die über einen Zeitraum von etwa 40 Minuten beobachtet werden konnte, unterschied sich im Verlauf nicht vom Kontrollexperiment mit PBS. Um zu zeigen, daß PBS selbst keinen Einfluß auf die Auxinsensitivität des Systems hat, wurde eine Probe mit IAA und PBS inkubiert (Abb. 27, vgl. Abb. 24).

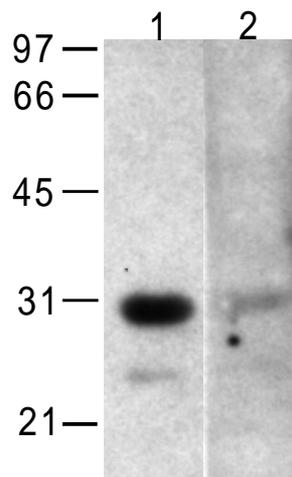


Abb. 26: Western-Blot-Analyse mit Kompetitionskontrolle. Rekombinant exprimiertes UBQ-ZmERabp1 wurde über SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde geteilt und mit anti-C-Terminus-Antikörper inkubiert (1). Die Konkurrenz erfolgte mit Mais-Peptid T11/12 (2).

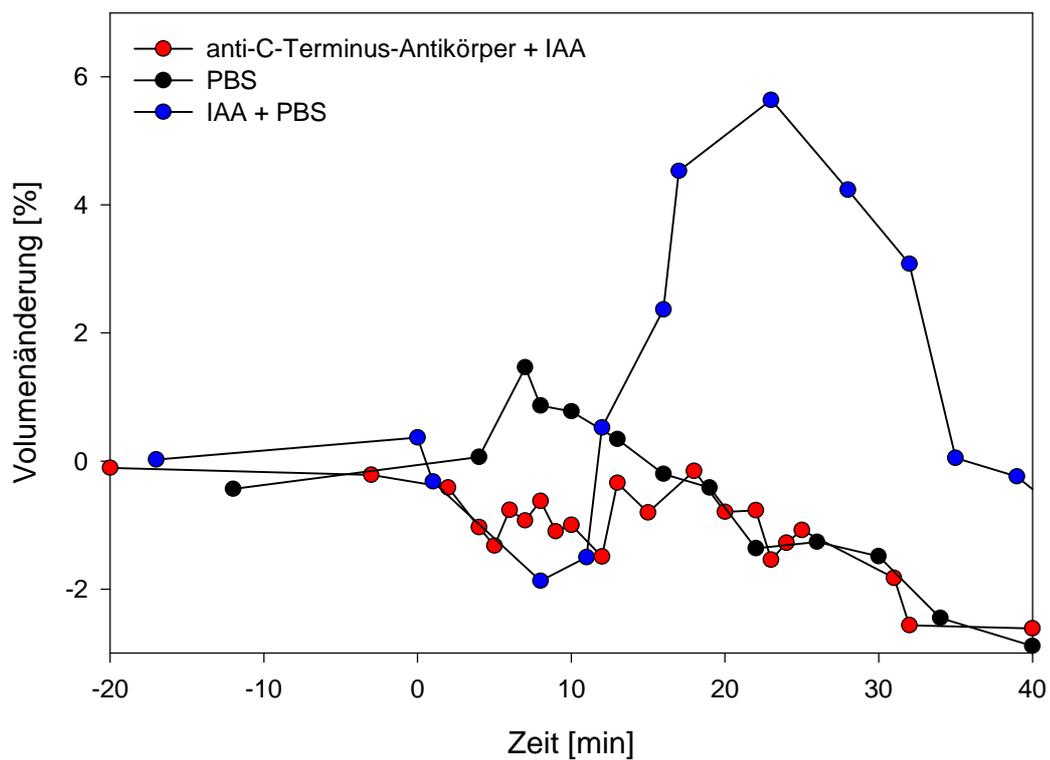


Abb. 27: Einfluß des anti-C-Terminus-Antikörpers auf die Auxin-induzierte Volumenänderung von Maisprotoplasten. Nach Präinkubation der Protoplasten mit dem Antikörper (10^{-8} M) erfolgte die Zugabe von 10^{-6} M IAA (rot). In Kontrolleexperimenten wurden die Protoplasten nur mit PBS versetzt (schwarz) bzw. mit 10^{-6} M IAA und PBS (blau). Die Zugabe erfolgte bei $t = 0$ min.

3.5.4 C-terminales Peptid T11/12 aus Mais

Bereits frühere Experimenten gaben Hinweise auf eine Beteiligung des C-Terminus bei der Auxinsignaltransduktion. Synthetische C-terminale Peptide, abgeleitet von den Primärsequenzen von ZmERabp1 bzw. NtERabp1 vermochten Auxinantworten zu induzieren (Thiel *et al.*, 1993; Gehring *et al.*, 1998; Leblanc *et al.*, 1999a).

Der Effekt des C-Terminus von ZmERabp1 auf die Schwellantwort des Maisprotoplastensystems sollte untersucht werden. Dazu wurde ein Peptid synthetisiert, das aus den 17 Aminosäuren des C-Terminus von ZmERabp1 besteht (Abb. 28). Mikromolare Konzentrationen des Peptids induzierten eine Volumenzunahme der Protoplasten, in der Amplitude ähnlich stark, wie der anti-AtERabp1-Peptidantikörper und somit stärker als die optimale Auxinkonzentration. Im Gegensatz zur Auxinantwort bzw. zur Induktion mit anti-AtERabp1-Peptidantikörper zeigte das Peptid-induzierte Wachstum keine anfängliche negative Antwort. Als Kontrolle wurde ein beliebiges synthetisches Peptid eingesetzt, das keinen Effekt aufwies (Abb. 28).

C-terminales Peptid T11/12:

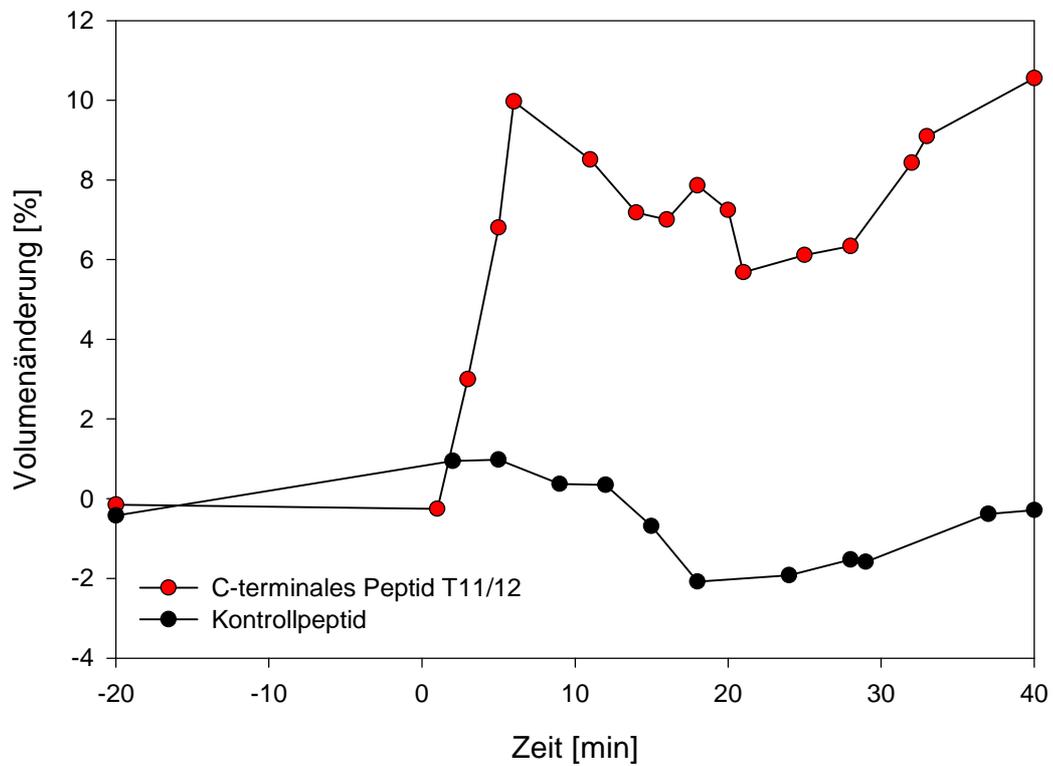
 NH_2 - F P F V W D E D C F E A A K D E L - COOH

Abb. 28: Peptid-induzierte Volumenänderung eines Maisprotoplasten. Zugabe von 10^{-6} M Peptid T11/12 (rot) bzw. eines Kontrollpeptids (schwarz) bei $t = 0$ min.

4 Diskussion

4.1 Expressionsanalyse von AtERabp1

Northern-Blot-Analysen

Zur umfassenden Charakterisierung des *AtERabp1*-Gens wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Das *AtERabp1*-Gen ist relativ schwach transkribiert, da die Isolierung von poly(A)⁺-RNA und die Verwendung sensitiver Phosphorscreens zur Detektion des Transkripts notwendig waren. Es wird allgemein davon ausgegangen, daß die Expression von *ERabp1* in allen dikotyledonen Pflanzen sehr viel schwächer ist als in monokotyledonen Pflanzen (Lazarus und Macdonald, 1996; Leblanc *et al.*, 1997). Der Vergleich der analysierten Gewebe zeigte, daß die *AtERabp1*-Transkriptmenge in Blüten am höchsten ist (100 %). Die relative mRNA-Menge in Hypokotyl beträgt 35 %, in Blättern 26 %, in Sproßachsen 12 % und in Wurzeln 8 %. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Expressionsanalysen des *ZmERabp1*-Gens aus Mais (Hesse *et al.*, 1989) und des *NtERabp1*-Gens aus Tabak (Leblanc *et al.*, 1997) überein. In diesen Pflanzen ist die Transkriptmenge in Wurzeln am niedrigsten und in Blüten und Knospen (Tabak) bzw. Blütenorganen (Mais) am höchsten. Die mRNA-Menge in Blättern und Sproßachsen ist in Mais vergleichbar groß, während Tabakblätter eine höhere Transkriptmenge aufweisen als Tabaksproßachsen.

Ferner wurde die *AtERabp1*-Promotoraktivität mit Hilfe des Promotor-GUS-Systems untersucht (Feckler, 1997). Dazu wurden transgene Pflanzen hergestellt, die das *GUS*-Reportergen unter der Kontrolle einer 1,2 kb umfassenden Region des *AtERabp1*-Promotors exprimieren. Die Analyse ergab eine spezifische Färbung mehrerer unabhängiger Linien ausschließlich in der Hypokotylregion und den Blattansätzen. Diese Färbung ist nur zum Teil mit der Northern-Blot-Analyse in Einklang zu bringen; es wurde keine Färbung in Blüten detektiert, die der Transkriptanalyse nach die höchste Expression aufwies. Daher muß davon ausgegangen werden, daß bei der Expression von *AtERabp1* Promotorelemente eine Rolle spielen, die nicht in der für die GUS-Analyse verwendeten 1,2 kb umfassenden Region enthalten sind. Die Expression eines Gens kann auch durch Sequenzen kontrolliert werden, die innerhalb des translatierten Bereichs liegen (Sieburth und Meyerowitz, 1997).

Western-Blot-Analysen

Northern-Blot-Analysen geben Aufschluß über den im analysierten Gewebe vorhandenen mRNA-Spiegel. Allerdings erlaubt diese Untersuchung keinen direkten Rückschluß auf die exprimierte Proteinmenge in diesen Geweben (Gygi *et al.*, 1999). Erst im Vergleich mit der tatsächlich vorhandenen Proteinmenge können Aussagen über die Regulation der Proteinexpression gemacht werden. Aus diesem Grund wurden Western-Blot-Analysen mit mikrosomalen Proteinen durchgeführt. Es fällt auf, daß die detektierten Signalstärken nicht mit den Signalstärken der Northern-Blot-Analyse übereinstimmen. Die schwächsten Signale sind in Blüten und im Hypokotyl zu finden, das stärkste in den Wurzeln. Die Signale in Sproßachsen und Rosettenblättern sind etwa gleich stark. Die große Diskrepanz zwischen der Transkription des *AtERabp1*-Gens und dem tatsächlich vorhandenen Proteinspiegel läßt darauf schließen, daß die Expression des Proteins in den untersuchten Geweben unterschiedlich reguliert wird. Der in Blüten detektierte hohe mRNA-Spiegel könnte darauf hinweisen, daß die Proteinexpression relativ schnell erhöht werden kann. Ähnliches würde für das Hypokotylgewebe gelten, in dem ein relativ hoher mRNA-Spiegel einem relativ geringen Proteinspiegel gegenübersteht. Im Gegensatz dazu nimmt das Wurzelgewebe eine Sonderstellung ein. Dem Gewebe mit dem geringsten mRNA-Spiegel steht eine Proteinexpression gegenüber, die die Expression in anderen untersuchten Geweben um ein Vielfaches übersteigt. Eine mögliche Ursache könnte eine erhöhte mRNA-Stabilität sein, die zu einer erhöhten Proteinexpression führt bzw. eine hohe Stabilität des Proteins selbst.

Neben der hohen Proteinexpression in Wurzel ist eine weitere Abweichung zu den anderen Geweben zu konstatieren. Während in allen anderen untersuchten Geweben in Western-Blot-Analysen ein Signal bei einer apparenten molekularen Masse von etwa 24 kDa detektiert werden konnte, zeigte der anti-*AtERabp1*-Peptidantikörper eine Immunreaktion mit einem Protein mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 20 kDa. In *A. thaliana* existiert im Gegensatz zu anderen Pflanzenspezies keine ABP-Genfamilie (Palme *et al.*, 1992). Wie die Northern-Blot-Analyse zeigte, besitzt das *AtERabp1*-Transkript in allen Geweben dieselbe Größe. Daher kann die geringere apparente molekulare Masse von *AtERabp1* aus Wurzelkultur durch zwei Phänomene erklärt werden. Einerseits könnte durch posttranslationale Modifikation eine Deletion im Protein entstanden sein. Dabei würde eine Deletion von etwa 30 bis 40 Aminosäuren einen Massenunterschied von 4 kDa bewirken. Andererseits besitzt *AtERabp1* wie alle Auxin-bindenden Proteine aus Dikotyledonen zwei

potentielle Glykosylierungsstellen. Für NtERabp1 konnte gezeigt werden, daß diese Stellen tatsächlich glykosyliert sind (Watanabe und Shimomura, 1998). In einer vorläufigen Untersuchung wurden mikrosomale Proteine aus Maiskoleoptilen und aus Wurzeln von *A. thaliana* mit PNGase F deglykosyliert und mittels Western-Blot analysiert (Feckler, unveröffentlicht). In beiden Proben wurde ein Signal mit derselben apparenten molekularen Masse bei 20 kDa detektiert. Daher liegt die Vermutung nahe, daß AtERabp1 aus Wurzel entweder völlig deglykosyliert vorliegt oder die Zuckerstruktur stark modifiziert ist. Ein ähnliches Phänomen wurde durch Analyse eines Auxin-bindenden Proteins aus Primärwurzeln und Wurzelhaaren von Mais festgestellt (Radermacher und Klämbt, 1993). Das isolierte Protein wurde in Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen ZmERabp1 aus Koleoptilen detektiert, allerdings bei einer kleineren apparenten molekularen Masse von 18,6 kDa (statt 21,3 kDa für ZmERabp1). Obwohl eine Glykosylierung des Proteins detektiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Zuckerstruktur des Auxin-bindenden Proteins aus Wurzel von *Z. mays* vom mannosereichen Typ in ZmERabp1 aus der Koleoptile unterscheidet.

Lokalisation von AtERabp1 in Wurzel

Um AtERabp1 auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden immuncytochemische Analysen von Wurzelquerschnitten durchgeführt. Das Protein konnte in allen Zellen junger Wurzeln deutlich detektiert werden. In Western-Blot-Analysen wurde AtERabp1 ausschließlich in der mikrosomalen Fraktion detektiert. Das in Wurzelquerschnitten detektierte Signal war allerdings nicht auf das ER beschränkt, sondern erstreckte sich über die gesamte Zelle mit Ausnahme der Vakuolen und des Zellkerns. In einer Untersuchung von ZmERabp1 in Koleoptilen und Embryonen von *Z. mays* ergab die Immunlokalisation neben der Markierung des ER auch eine Detektion des Proteins im Cytosol und im Zellkern (Bronsema *et al.*, 1998). Daß AtERabp1 in Western-Blot-Analysen nicht in der löslichen Fraktion detektiert wurde, könnte seine Begründung in der geringen Konzentration im Cytosol haben. Zahlreiche physiologische Untersuchungen der Auxin-bindenden Proteine, u. a. auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, weisen darauf hin, daß das Protein in seiner funktionell aktiven Form plasmamembranständig lokalisiert sein sollte (Übersicht s. Venis und Napier, 1995; Steffens *et al.*, 2000). Dennoch konnte keine dominierende Markierung der Plasmamembran festgestellt werden. Es bleibt zu klären, ob der detektierten Massenunterschied zwischen

AtERabp1 aus Wurzeln und AtERabp1 aus den anderen Geweben die Ursache für die subzelluläre Lokalisation des Proteins darstellt; z. B. könnte eine Deletion des C-Terminus zum Verlust des ER-Retentionssignals führen. Daher wurde der gegen den C-Terminus von AtERabp1 gerichtete Antikörper in Western-Blot-Analysen eingesetzt. Allerdings konnte weder in mikrosomalen Proteinen aus Blättern noch in mikrosomalen Proteinen aus Wurzeln ein Signal detektiert werden (nicht gezeigt).

Lokalisation von AtERabp1 während der Embryonalentwicklung

AtERabp1 spielt sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung von *A. thaliana*. Es gelang die Isolierung einer heterozygoten *A. thaliana* Mutante, die eine *T-DNA*-Insertion im *AtERabp1*-Gen trägt. Die nach Selbstung entstandenen homozygoten Embryonen sind in einem frühen Stadium letal (Chen *et al.*, 2000). Daher wurden Embryonen von *A. thaliana* durch Immunlokalisation von AtERabp1 untersucht. Das Protein war in frühen Entwicklungsstadien stark exprimiert, vergleichbar mit der Expression in jungen Wurzeln. Die Lokalisation konnte bis zum Torpedostadium verfolgt werden und war ab dem gebogene Keimblätterstadium nicht mehr detektierbar. Dies zeigt, daß AtERabp1 stadienspezifisch exprimiert wird. Allerdings erstreckte sich das Signal analog der Färbung im Wurzelgewebe über die gesamte Zelle und korrelierte somit nicht mit der postulierten Funktion an der Plasmamembran. Trotzdem ist dieses Expressionsmuster ein Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins bei der Entwicklung des Embryos.

4.2 Homologe Expression in *A. thaliana*

Es standen transgene homozygote *A. thaliana* Pflanzen zur Verfügung, in denen die *AtERabp1*-cDNA in *sense*- und *antisense*-Orientierung unter der Kontrolle eines aktivierbaren Promotors stand. Durch Kreuzung mit einer Aktivatorlinie wurde die Expression eingeleitet. Die Transkription der *AtERabp1*-cDNA wurde nach der Aktivierung in der T2-Generation analysiert. Ein erhöhter Transkriptspiegel konnte durch Northern-Blot-Analysen in einer *sense*- und in drei *antisense*-Pflanzen nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen endo- und exogenem Transkript war nicht möglich.

Eine Überprüfung auf Proteinebene ergab jedoch keine signifikante Veränderung des Proteinspiegels in den analysierten Geweben der aktivierten Pflanzen. Die Expressionsanalyse von AtERabp1 hatte gezeigt, daß die Expression des Proteins nicht mit dem mRNA-Spiegel korreliert. Eine mögliche posttranskriptionale Regulation könnte eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen hoher Transkription (13fach über Wildtyp) aber unveränderter Proteinmenge in der AtERabp1-*sense*-Linie sein.

Die Reduktion endogener Genexpression durch die Transkription der entsprechenden *antisense*-RNA ist eine vielfach angewandte Methode zur funktionellen Charakterisierung von Genen. Trotz der intensiven Nutzung ist über den Mechanismus noch sehr wenig bekannt (Übersicht s. Bourque, 1995). Im allgemeinen wird davon ausgegangen, daß die *antisense*-RNA mit der endogenen RNA hybridisiert. In vielen Fällen wurde eine starke Reduktion der endogenen mRNA-Menge beobachtet. Eine Erklärung dafür ist, daß das gebildete RNA/RNA-Hybrid instabil ist und durch RNasen abgebaut wird. Es sind allerdings auch Studien bekannt, die belegen, daß zwar die Proteinmenge, nicht aber die endogene mRNA-Menge reduziert ist (Oliver *et al.*, 1993; Temple *et al.*, 1993). Diese Beobachtung wird darauf zurückgeführt, daß das gebildete RNA/RNA-Hybrid stabil ist; es wird aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert und verhindert dort die Bindung der Ribosomen. In den aktivierten *antisense*-Pflanzen konnte allerdings keine Verringerung der AtERabp1-Proteinmenge detektiert werden. In den Northern-Blot-Analysen wurde die Summe aus endogenem *sense*- und exogenem *antisense*-Transkript detektiert. Die detektierte mRNA-Menge lag 3- bis 9fach über dem Wildtypspiegel. Eine Erklärung dafür wäre eine Verstärkung der endogenen Transkription durch den erhöhten *antisense*-Transkriptspiegel.

4.3 Massenspektrometrische Untersuchung von ZmERabp1

Identifizierung einer Disulfidbrücke in ZmERabp1

Die Faltung eines Proteins wird zu einem großen Teil durch seine Primärstruktur bestimmt. Jedoch kann die Einführung einer kovalenten Bindung ebenfalls einen Einfluß auf die Tertiärstruktur haben. Durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke können zwei Domänen des Proteins in räumliche Nähe gebracht werden, die ohne die kovalente Bindung getrennt wären. Für einige Proteine wurde gezeigt, daß sie nach Reduktion ihre Sekundär- und Tertiärstruktur

verlieren und damit auch ihre Aktivität (Thornton, 1981). Außerdem besitzen disulfidverknüpfte Proteine eine größere Stabilität. Der Stabilitätsgewinn eines Proteins mit Disulfidbrücke kann einerseits mit einer größeren Rigidität der Proteinstruktur erklärt werden. Ferner wird vermutet, daß neben diesem „mechanischen“ auch ein Entropie-Einfluß zum Tragen kommt. Der Entropiegewinn bei der Denaturierung eines kovalent verknüpften Proteins ist geringer als bei der Denaturierung der freien Polypeptidkette, da die Anzahl der Freiheitsgrade verringert ist (Wetzel, 1987).

Es wurde die Identität und Lage einer Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys61 in ZmERabp1 aufgeklärt. Dies wurde durch zwei unabhängige Experimente bewiesen. Im ersten Experiment wurden die Cysteinreste ihres Redoxzustandes gemäß markiert, d.h. die Sulfhydrylgruppe des Cys155 wurde mit 4-Vinylpyridin derivatisiert, während die die Disulfidbrücke ausbildenden Cysteinreste Cys2 und Cys61 nach Reduktion mit Iodacetamid derivatisiert wurden. Die Suche nach anderen möglichen Spezies, d.h. nach Peptiden, die eine andere Derivatisierung aufwiesen, blieb erfolglos. Damit ist es unwahrscheinlich, daß während der Isolierung ein Disulfidaustausch stattgefunden hat, welcher sich bei basischem pH-Wert ereignen kann. Daß die beiden mit Iodacetamid markierten Cysteinreste tatsächlich eine kovalente Bindung ausbilden, wurde in einem zweiten Experiment durch einen tryptischen Verdau von nichtreduziertem ZmERabp1 gezeigt. Die cysteinhaltigen Peptide T1 und T6 wurden als eine Molekülspezies detektiert und mittels partieller Sequenzierung (MS/MS) identifiziert. Den direkten Beweis für die Natur der kovalenten Bindung lieferte die Detektion zweier Fragment-Ionenpaare (m/z 1258,6 und 496,4, sowie 1323,7 und 430,3). Sie entstehen durch asymmetrische Spaltung der Disulfidbrücke; hierbei verbleiben beide Schwefelatome an einem Peptidfragment. Diese Art der Fragmentierung ist spezifisch für Peptide, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind.

Im Falle von ABP1 wiesen bereits frühe Experimente auf die Bedeutung einer Disulfidbrücke bei der Auxinbindung hin (Ray und Dohrmann, 1977). Nach reduktiver Behandlung von Maismikrosomen verringerte sich ihre spezifische NAA-Bindeaktivität. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde ebenfalls die Frage nach der Lage einer möglichen Disulfidbrücke gestellt (Leblanc *et al.*, 1999b). Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen rekombinant exprimiertes ABP1 aus Tabak (NtERabp1), synthetischen Peptiden abgeleitet aus der NtERabp1 Primärsequenz und der Oberflächen-Plasmon-

Resonanztechnik wurde eine Epitopkarte des Proteins aufgestellt. Basierend auf dieser Karte wurde eine Disulfidbrücke zwischen dem zweiten (Cys82) und dritten (Cys177) Cysteinrest in NtERabp1 postuliert. Allerdings wurde NtERabp1 in *E. coli* exprimiert und reduzierend (DTT) isoliert (Leblanc *et al.*, 1997). Daher muß davon ausgegangen werden, daß das analysierte NtERabp1 keine Disulfidbrücke aufwies oder daß diese sich erst nach der Isolierung des Proteins zufällig ausgebildet hat. Die Aussagen bezüglich einer Disulfidbrücke entbehren also der Grundlage.

Eine weitere Strukturanalyse wurde mit heterolog exprimiertem ZmERabp1 aus Insektenzellen durchgeführt. Dabei wurde das isolierte Protein kristallisiert. Den Abstand der Aminosäuren Cys61 und Cys155 im Kristall interpretieren die Autoren als Hinweis auf eine kovalente Bindung zwischen den Cysteinresten (Napier *et al.*, 2000). Allerdings lagen den Experimentatoren keine Informationen zu einer Lage der Disulfidbrücke im nativen Protein vor. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Proteine, die in heterologen Systemen exprimiert werden, eine andere Disulfidbrücke aufweisen als die nativ isolierten.

Bestimmung der molekularen Masse von ZmERabp1

Mit Hilfe eines Elektrospray-Massenspektrometers wurde die molekulare Masse von ZmERabp1 bestimmt. Sie beträgt 20243 Da einschließlich des Glykanrestes. Bei der gewählten Ionisierungsart blieben Disulfidstrukturen erhalten. Daher konnte auch mit dieser Methode gezeigt werden, daß ZmERabp1 nicht über eine intermolekulare Disulfidbrücke dimerisiert, wie bereits mittels nichtreduzierendem SDS-PAGE festgestellt wurde (Shimomura *et al.*, 1986). Des weiteren wurde die molekulare Masse des Glykanrests bestimmt. Sie entsprach mit einer Abweichung von 0,5 Da dem postulierten mannosereichen Typ (Hesse *et al.*, 1989). Ferner konnten unterschiedliche Glykosylierungsspezies detektiert werden, die sich um jeweils einen Hexoserest unterschieden. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Glykoproteinen wie z.B. Ribonuklease B beobachtet (Burlingame, 1993). Die Ursache könnte eine unvollständige Glykosylierung sein, die quasi als natürliche Nebenreaktion auftritt. Andererseits könnten die Glykoformen ein Hinweis auf eine spezifische Prozessierung des Glykanrestes sein, die für Glykoproteine im Golgi-Apparat stattfindet. Diese Interpretation könnte ein weiterer Hinweis zur Stützung der Theorie der Translokation von ZmERabp1 zur Plasmamembran sein.

Die Existenz einer Disulfidbrücke in ZmERabp1 erlaubt folgende Rückschlüsse:

1. Da das Cytoplasma ein reduzierendes Milieu darstellt, kommt für ZmERabp1 nur eine kompartimentierte oder extrazelluläre Lokalisierung in Frage. Der strukturelle Vergleich einiger charakterisierter Proteine belegt, daß Disulfide hauptsächlich in extrazellulären Proteinen auftreten und daß in diesen Proteinen in der Regel nicht mehr als eine freie Thiolgruppe vorhanden ist (Thornton, 1981).
2. Aufgrund der hohen Homologie mit drei Cysteinresten an konservierter Position ist es wahrscheinlich, daß die Lage der Disulfidbrücke in allen Auxin-bindenden Proteinen gleich ist.
3. Im allgemeinen sind freie Sulfhydryle sehr oxidationsanfällig. Daher kann postuliert werden, daß der C-terminale Cysteinrest entweder intramolekular verborgen ist, oder durch Interaktion mit einem weiteren Protein (Dimerisierung, *docking protein*) vor Oxidation geschützt bleibt.

4.4 Renaturierung von AtERabp1

Für die geplanten Untersuchungen wurden einige Milligramm von AtERabp1 benötigt. Expressionsversuche in eukaryotischen Systemen, wie z.B. Hefe oder Insektenzellen scheiterten an einer zu niedrigen Expressionsrate. Die Expression mit einer Signalsequenz für das Periplasma von *E. coli*, in dem die Ausbildung von Disulfidbrücken möglich ist, mißlang ebenfalls. Daher wurde das Protein im Cytosol von *E. coli* exprimiert, isoliert und anschließend renaturiert. Erste Hinweise, daß zumindest ein Teil von AtERabp1 im gefalteten Zustand vorlag ergab der Vergleich der Fluoreszenzspektren von renaturiertem und denaturiertem Protein. Die Verschiebung des Maximums belegte, daß die Tryptophanreste, deren Fluoreszenz bei der Messung detektiert wurde, in der renaturierten Probe im hydrophoben Kern des Proteins verborgen waren, während sie im denaturierten Protein im Kontakt mit dem Lösungsmittel standen. Das Fluoreszenzmaximum von Tryptophan kann zwischen 308 nm in dem Protein Azurin und 350 nm bei völlig entfaltenen Proteinen variieren (Eftink, 1997). Die Verringerung der Intensität des Fluoreszenzmaximums kann auf

Fluoreszenzlöschung aufgrund des Kontakts des Fluorophors (Tryptophan) mit dem Lösungsmittel (Wasser) zurückgeführt werden; ein weiterer Grund kann der Verdünnungseffekt nach der Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid sein.

Zur weiteren Charakterisierung des renaturierten AtERabp1 wurden Ligandtitrationen mit 1-Naphthylessigsäure (1-NAA) und der dazu isomeren 2-Naphthylessigsäure (2-NAA) durchgeführt. Die Bindung eines Liganden an ein Protein kann auf verschiedene Weise Einfluß auf die intrinsische Tryptophanfluoreszenz nehmen. Einerseits kann der Ligand direkt die Fluoreszenz löschen oder durch Anlagerung an Tryptophan den Fluorophor verändern. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß der Ligand eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt und somit indirekt dessen spektroskopische Eigenschaften ändert. Diese Änderungen können sowohl in einer Verstärkung oder Löschung der Fluoreszenz, als auch in der Verschiebung des Maximums resultieren (Eftink,1997). Die Titration von 1-NAA zum renaturierten Protein ergab eine konvergierende Abnahme der Fluoreszenz. Im Vergleich dazu zeigte die Titration des Liganden zu einer denaturierten Probe im Mittel keine Veränderung der Fluoreszenzintensität. Somit wurde einerseits gezeigt, daß Auxin nur an renaturiertes AtERabp1 bindet. Andererseits konnte ausgeschlossen werden, daß 1-NAA als Anion über rein ionische Wechselwirkung an den positiv geladenen Hexahistidinrest bindet; wäre dies der Fall gewesen, hätte ebenfalls eine Änderung der Fluoreszenz beobachtet werden müssen. Dasselbe Experiment wurde mit der als Auxin nicht wirksamen 2-NAA durchgeführt. Auch diese Titration ergab eine konvergierende Abnahme der Fluoreszenz. Aus beiden Graphen wurden die Dissoziationskonstanten der Protein-Ligand-Komplexe berechnet.

ZmERabp1 wurde von drei verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert und charakterisiert. Zum Vergleich wurden die in dieser Arbeit ermittelten Bindungsdaten (Dissoziationskonstanten, K_D) von renaturiertem AtERabp1 mit 1-NAA und 2-NAA den Bindungsdaten von aus *Z. mays* isoliertem ZmERabp1 gegenübergestellt (Tab. 4).

	K_D 1-NAA [M]	K_D 2-NAA [M]
Hesse <i>et al.</i> , 1989	$2,4 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-5}$
Shimomura <i>et al.</i> , 1986	$5,9 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-7}$
Löbler und Klämbt, 1985	$2,4 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-7}$
AtERabp1, renaturiert	$2,3 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-7}$

Tab. 4: Gegenüberstellung der Dissoziationskonstanten der Protein-Ligand-Komplexe aus ZmERabp1 bzw. AtERabp1 und 1-NAA bzw. 2-NAA.

Beim Vergleich der Literaturwerte fällt auf, daß unterschiedliche Affinitäten von ZmERabp1 zu 1-NAA bzw. 2-NAA ermittelt wurden. Allerdings liegen die meisten Werte bei 10^{-7} M, mit Ausnahme der Bindungskonstanten für 2-NAA bei Hesse *et al.* ($2,0 \times 10^{-5}$ M). Die in dieser Arbeit ermittelten Dissoziationskonstanten von renaturiertem AtERabp1 mit 1-NAA bzw. 2-NAA liegen bei 10^{-6} M bzw. 10^{-7} M. Damit liegen diese Werte in der Größenordnung der für ZmERabp1 gefundenen Bindungskonstanten. Die Tatsache, daß 2-NAA stärker gebunden wird als 1-NAA, korreliert nicht mit den Literaturwerten. Selbstverständlich können die Dissoziationskonstanten von AtERabp1 und ZmERabp1 nur bedingt miteinander verglichen werden, da sich die Proteine in der Primärsequenz unterscheiden (55 % Ähnlichkeit, Anai *et al.*, 1997). Es ist wahrscheinlich, daß die Affinitäten zu den jeweiligen Liganden differieren. Eine wichtige Fehlerquelle der Messungen in dieser Arbeit war die grobe Schätzung der eingesetzten Proteinkonzentration. Für die erste Überprüfung eines Rückfaltungsansatzes hat sich die Methode jedoch als sinnvoll erwiesen, da eine Bindung von 1-NAA bzw. 2-NAA an AtERabp1 gezeigt werden konnte. Bei der weiteren Analyse wird es allerdings notwendig sein, die diversen Faltungsspezies in der renaturierten Probe zu trennen. Dies kann mittels Hydrophober Interaktionschromatographie erreicht werden. In korrekt gefalteten Proteinen liegen die hydrophoben Aminosäurereste im Kern, während sich die hydrophilen Seitenketten außen befinden. Jede Störung der nativen Konformation hätte eine Verringerung der Hydrophilität zur Folge. Demnach sind falsch gefaltete Proteine hydrophober und werden daher von einer hydrophoben Matrix stärker gebunden. Weiterhin ist es notwendig, die Disulfidstruktur des renaturierten Proteins zu bestimmen und diese mit der in dieser Arbeit für ZmERabp1 bestimmten Struktur zu

vergleichen. Mit einer reinen, nativen Proteinfraction sollte es dann möglich sein, genauere Bindungsdaten zu erhalten.

4.5 Funktionelle Untersuchungen von ZmERabp1

Es wurde ein System zur Analyse der Auxinsignaltransduktion in Maisprotoplasten etabliert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen AtERabp1 und einem Peptid abgeleitet aus der Primärsequenz von *Z. mays* wurde überprüft, ob die Funktionsanalyse von ZmERabp1 in diesem System möglich ist.

Anti-AtERabp1-Antikörper - Induktion einer Auxin-analogen Volumenänderung

Die Zugabe von 10^{-8} M anti-AtERabp1-Antikörper zu Maisprotoplasten bewirkte eine Veränderung des Volumens in analoger Weise wie die Zugabe von 10^{-6} M IAA. Charakteristisch für den Verlauf der Auxinantwort in diesem System war die anfängliche Volumenabnahme (Schrumpfen), gefolgt von einer Volumenzunahme über das Ursprungsvolumen des Protoplasten hinaus. In früheren Studien zur Funktionsanalyse von NtERabp1 wurde die Auxin-induzierte Hyperpolarisation des Transmembranpotentials von Tabakprotoplasten gemessen (Barbier-Brygoo, *et al.*, 1989; Venis *et al.*, 1992). Diese Hyperpolarisation ist zwei Minuten nach Auxinzugabe abgeschlossen und zeigte keine dem Schrumpfen analoge antagonistische Antwort (Ephritikhine *et al.*, 1987). Auxineffekte, die mit Pflanzenorganen untersucht wurden, wie Streckungswachstum (Tietze-Haß und Dörfling, 1977; Fischer *et al.*, 1992), Transmembranhyperpolarisation (Felle *et al.*, 1991) sowie Protonenflux (Lüthen *et al.*, 1990) zeigten eine Verzögerung von 10 bis 20 Minuten. Außerdem wurde während dieser Zeit in allen genannten Experimenten eine vorübergehende antagonistische Antwort beobachtet, die mit der anfänglichen Volumenabnahme des Protoplasten korrelierte. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf des Antikörpereffekts mit dem klassischen Auxin-induzierten Koleoptilenstreckungswachstum, so fällt die deutliche Übereinstimmung auf. Der Beginn der Streckung setzte erst nach etwa 15 bis 20 Minuten ein; in dieser Zeit war der Protoplast nach anfänglichem Schrumpfen wieder auf seine ursprüngliche Größe geschwollen, so daß die Nettovolumenzunahme bzw. das Wachstum in beiden Systemen zeitgleich einsetzte. Außerdem wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Volumenzunahme bestimmt. Die maximale Volumenzunahme wurde mit einer Antikörperkonzentration von 10^{-8} M ermittelt. Diese Konzentration entspricht exakt den

Ergebnissen der Antikörper-induzierten Tabakprotoplasten-Hyperpolarisation (Venis *et al.*, 1992).

Dieses Experiment stellt erstmals einen direkten sowohl zeitlich als auch mechanistisch vergleichbaren Zusammenhang zwischen ZmERabp1 und dem klassischen Auxin-induzierten Streckungswachstum her. Somit wird die Theorie gestützt, nach der die Sequenz, gegen die der Antikörper gerichtet ist, die Auxinbindungsstelle bzw. einen Teil daraus darstellt (Venis *et al.*, 1992). Die Bindung von Auxin respektive des Antikörpers soll der Theorie nach zu einer Änderung der Proteinkonformation und schließlich zum Auslösen der Auxinantwort führen (Macdonald, 1997). Dieser Teil der Theorie bleibt allerdings so lange Spekulation, bis weitere Komponenten dieser möglichen Auxinsignaltransduktionskaskade identifiziert worden sind.

Anti-C-Terminus-Antikörper - Hemmung der Auxin-induzierten Volumenänderung

Die Präinkubation der Maisprotoplasten mit 10^{-8} M anti-C-Terminus-Antikörper bewirkte eine Hemmung der Auxin-induzierten Volumenänderung. In früheren Experimenten zeigten Antikörper, die gegen das gesamte Protein gerichtet waren eine analoge Wirkung bei der Hemmung der Auxin-induzierten Hyperpolarisation des Transmembranpotentials (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989). Seit der beobachteten Wirkung von C-terminalen Peptiden auf die Auxinantwort wird dem C-Terminus von ABP1 eine Rolle in der Weiterleitung des Auxinsignals zugeschrieben (Thiel *et al.*, 1993; Gehring *et al.*, 1998; Leblanc *et al.*, 1999a). Demnach würden die Antikörper gegen den C-Terminus von ABP1 diese Antwort inhibieren. Somit stimmen die hier erhaltenen Ergebnisse ebenfalls mit denen aus der Literatur überein.

C-terminales Peptid aus ZmERabp1 - Induktion einer Auxin-ähnlichen Volumenänderung

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob der C-Terminus von ZmERabp1 in dem neuen Maisprotoplastensystem eine Auxin-analoge Wirkung zeigt. Die Zugabe von 10^{-6} M des Maispeptids T11/12 zu Maisprotoplasten bewirkte eine rasche Volumenzunahme. Auch in diesem System zeigte das C-terminale Peptid von ZmERabp1 einen ähnlichen Effekt wie in den früheren Untersuchungen. C-terminale Peptide, abgeleitet von den Primärsequenzen von ZmERabp1 und NtERabp1, induzierten im Tabakprotoplasten-System die Hyperpolarisation des Transmembranpotentials (Leblanc *et al.*, 1999a). Eine Erklärung für das fehlende Schrumpfen im Vergleich zur Auxin- bzw. Antikörper-induzierten Antwort könnte die

einfache Struktur des Peptids im Vergleich zum Gesamtprotein sein. Es ist möglich, daß Auxin zwei einander gegenläufige Antworten auslöst, von denen zu Beginn die Volumenabnahme und anschließend die Volumenzunahme dominiert. Es ist vorstellbar, daß diese vermutete komplexe Auxinantwort von einem Protein mit mehreren Domänen, nicht aber von einem Peptid ausgelöst werden könnte.

Die durchgeführten Experimente belegen eindrucksvoll die Anwendbarkeit des neu etablierten Systems zur funktionellen Analyse von ZmERabp1. Obwohl seit einiger Zeit ebenfalls intrazelluläre Auxinrezeptoren diskutiert werden (Vesper und Kuß, 1990; Lüthen *et al.*, 1999) unterstützen die gewonnenen Ergebnisse die Theorie einer Beteiligung von ZmERabp1 an einem plasmamembranständigen Auxinrezeptorkomplex.

Außerdem ist es gelungen, eine neue Methode zur funktionellen Analyse der Auxinantwort in Protoplasten zu entwickeln. Diese Methode stellt eine bessere zeitliche und mechanistische Korrelation zwischen der Wirkung von Auxin als Wachstoffsstoff und dem beobachteten Effekt der Volumenvergrößerung der Protoplasten her, als die bisher verwendeten Untersuchungssysteme.

4.6 Ausblick

Expression von AtERabp1

Bei der Expression des *AtERabp1*-Gens besteht keine offensichtliche Korrelation zwischen Transkript- und Proteinmenge. Dies läßt auf unterschiedliche Regulationsmechanismen in den einzelnen Geweben schließen. Von großem Interesse ist die Analyse von *AtERabp1* in Wurzelgewebe. Trotz der geringen Transkriptmenge ist der Proteinspiegel im Vergleich zu den anderen untersuchten Geweben am höchsten. Außerdem wird *AtERabp1* aus Wurzel bei einer kleineren apparenten molekularen Masse detektiert. Mit Hilfe des spezifischen anti-*AtERabp1*-Peptidantikörpers sollte es möglich sein, das Protein zu immunpräzipitieren und massenspektrometrisch zu analysieren. Eventuell können die Ergebnisse Gründe für die ungewöhnliche subzelluläre Lokalisierung in Wurzeln und Embryonen liefern.

Homologe Expression

Die Verwendung des Transkriptions-Aktivierungssystems hatte trotz deutlicher Veränderung des RNA-Spiegels in *A. thaliana* keine Auswirkungen auf den Proteinspiegel. Dennoch ist die Herstellung von transgenen *A. thaliana* Pflanzen bzw. Suspensionskulturen mit reduzierter oder ausgelöschter *AtERabp1*-Proteinexpression wichtig für weitere Untersuchungen. Ein nun zur Verfügung stehendes System basiert auf der Expression doppelsträngiger RNA in *A. thaliana* (Chuang und Meyerowitz, 2000). Mit Hilfe vier charakterisierter Gene aus *A. thaliana* konnte die vererbare sequenzspezifische Hemmung der Genfunktion gezeigt werden. Dieses System sowie die im Labor vielfach praktizierte Methode des *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfers sollen für einen neuen induzierbaren revers-genetischen Ansatz eingesetzt werden.

Biochemische Analyse von ZmERabp1

Um den Auxinsignaltransduktionsmechanismus aufzuklären und somit die Bedeutung Auxin-bindender Proteine zu beweisen, ist es unabdingbar, das Protein einer Kristallstrukturanalyse zu unterziehen. Die zu diesem Zweck benötigten Mengen des Proteins lassen sich in einer absehbaren Zeit allerdings nur rekombinant gewinnen. Deshalb war es wichtig, *ZmERabp1* als bisher einziges isolierbares Auxin-bindendens Protein so detailliert wie möglich zu charakterisieren. Mit den aus der massenspektrometrischen Analyse gewonnenen Daten ist es

jetzt möglich, rekombinant exprimiertes Protein zu überprüfen, um es für *in vitro* Analysen einzusetzen.

Renaturierung von rekombinant exprimiertem AtERabp1

Es wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, große Mengen (im Milligramm-Bereich) rekombinant exprimiertes AtERabp1 zu renaturieren. Die Trennung von falsch und korrekt gefalteten Proteinspezies wird aufgrund ihrer unterschiedlichen chromatographischen Eigenschaften möglich sein. Die Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Ermittlung von Bindungsdaten einerseits und die Information über die Lage der Disulfidbrücke andererseits werden eine umfangreiche Analyse des renaturierten Proteins ermöglichen. Mit der Renaturierungsmethode wurde somit der Grundstein gelegt, funktionell aktives AtERabp1 herzustellen, das in zahlreichen Experimenten (Kristallstrukturanalyse, Interaktionspartner-Analysen) eingesetzt werden soll.

Suche nach Interaktionspartnern

Die Koimmunpräzipitation ist eine Methode, um interagierende Proteine zu identifizieren. Mit dem in dieser Arbeit hergestellten anti-AtERabp1-Peptidantikörper kann dieses Experiment durchgeführt werden. Eine weitere Technik, Proteininteraktionspartner zu identifizieren, bietet die Oberflächenplasmonresonanz unter Verwendung des *Biacore*-Instruments (Lackmann *et al.*, 1996). Rekombinant exprimiertes AtERabp1 kann in großen Mengen renaturiert und zur Herstellung der Chipoberfläche verwendet werden. Über diese Oberfläche werden solubilisierete Membranproteine geleitet, die nach Adsorption analysiert werden können.

Funktionelle Untersuchungen von AtERabp1

Das neu entwickelte Maisprotoplastensystem bietet die Möglichkeit, eine Primärantwort von Auxin für die funktionelle Charakterisierung von Proteinen zu nutzen. Dieses System soll jetzt in *A. thaliana* etabliert werden, um die Untersuchungen von AtERabp1 in einem homologen System durchführen zu können. Dazu sollen transgene Pflanzen mit Hilfe der o. g. Doppelstrang-RNA-Technik hergestellt werden. Außerdem existieren zahlreiche Mutanten in der Modellpflanze *A. thaliana*, die mit Hilfe dieses Systems analysiert werden können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Auxin-bindenden Proteine AtERabp1 und ZmERabp1 untersucht.

Die AtERabp1-Expression ist sowohl anhand von Northern- und Western-Blot-Analysen eingehend charakterisiert worden. Transkript- und Proteinmenge differierten deutlich in den analysierten Geweben. Die Transkriptmenge in Blüten lag deutlich über den mRNA-Mengen der anderen untersuchten Gewebe; allerdings war der Proteinspiegel relativ gering. Im Gegensatz dazu stand bei der Analyse des Wurzelgewebes einem schwachen Signal im Northern-Blot ein sehr starkes Signal im Western-Blot gegenüber; dieses wurde bei einer kleineren apparenten molekularen Masse detektiert. Durch Immunlokalisation konnte eine stadienspezifische Expression von AtERabp1 in Embryonen nachgewiesen werden.

Unter Verwendung eines aktivierbaren Promotors konnte die Transkriptmenge von *AtERabp1* in *A. thaliana* Pflanzen durch *sense*- bzw. *antisense*-Expression verändert werden. Allerdings hatte dies keinen Einfluß auf die Proteinexpression bzw. resultierte nicht in einem sichtbaren Phänotyp der transgenen Pflanzen.

ZmERabp1 wurde aus Maiskoleoptilen isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Die molekulare Masse beträgt 20243 Da; der Glykanrest liegt in der mannosereichen Form vor. Es konnte bestätigt werden, daß ZmERabp1 nicht über eine Disulfidbrücke dimerisiert. Ferner wurde durch zwei unabhängige Experimente die Lage einer Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys61 identifiziert.

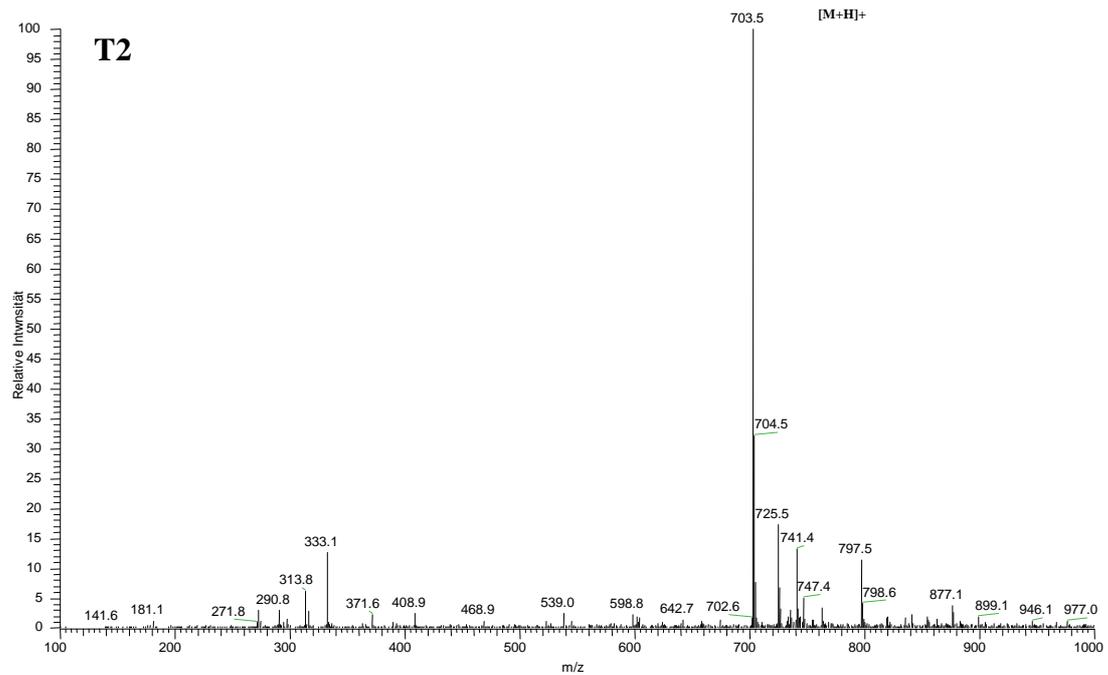
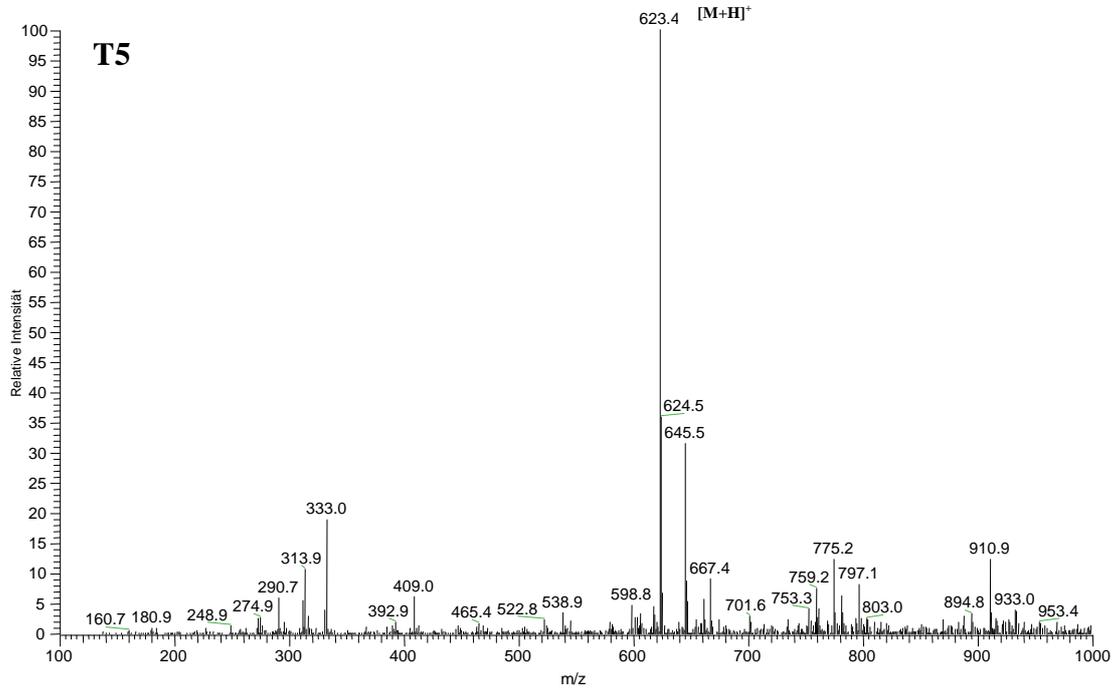
Für die Gewinnung großer Mengen von rekombinant exprimiertem AtERabp1 wurde eine Renaturierungsmethode entwickelt. Unter Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, daß das renaturierte Protein 1-NAA und 2-NAA bindet. Die Dissoziationskonstante für 1-NAA beträgt $2,3 \times 10^{-6}$ M und für 2-NAA 3×10^{-7} M.

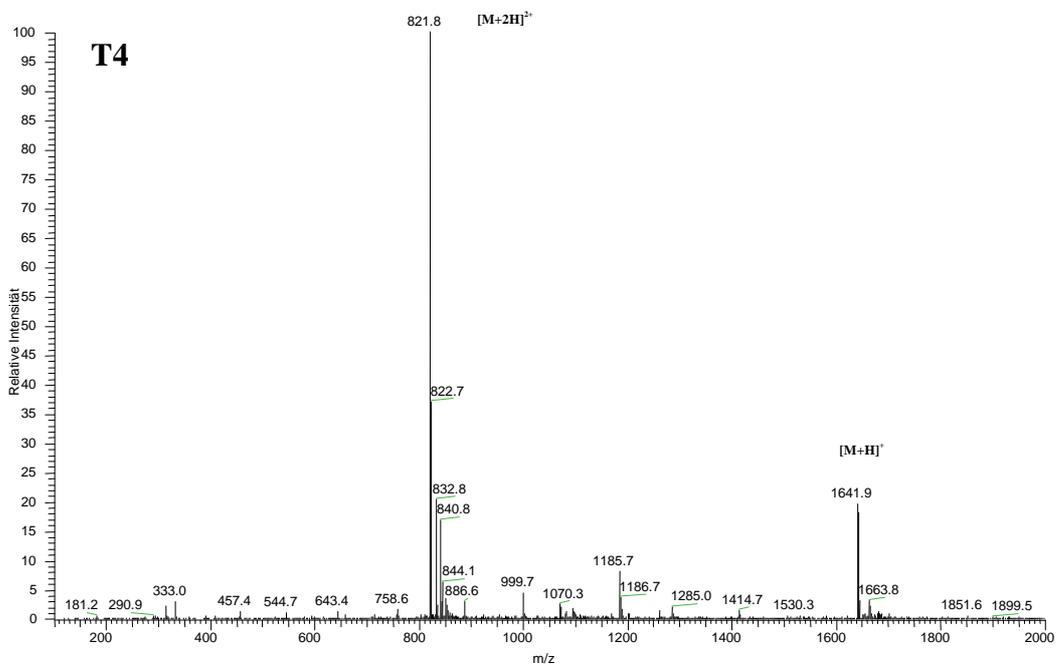
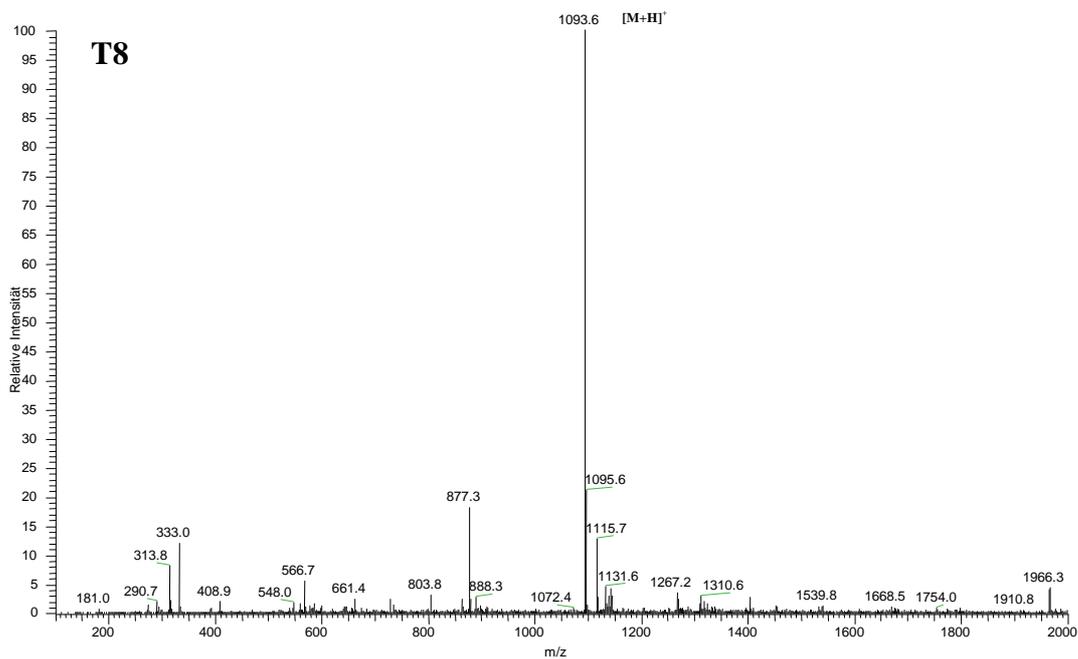
Mit Hilfe eines neu etablierten Systems ist es gelungen, ZmERabp1 funktionell zu charakterisieren. Isolierte Maisprotoplasten wurden mit Antikörpern gegen AtERabp1 inkubiert. Der gegen die postulierte Auxinbindestelle gerichtete Antikörper löste eine

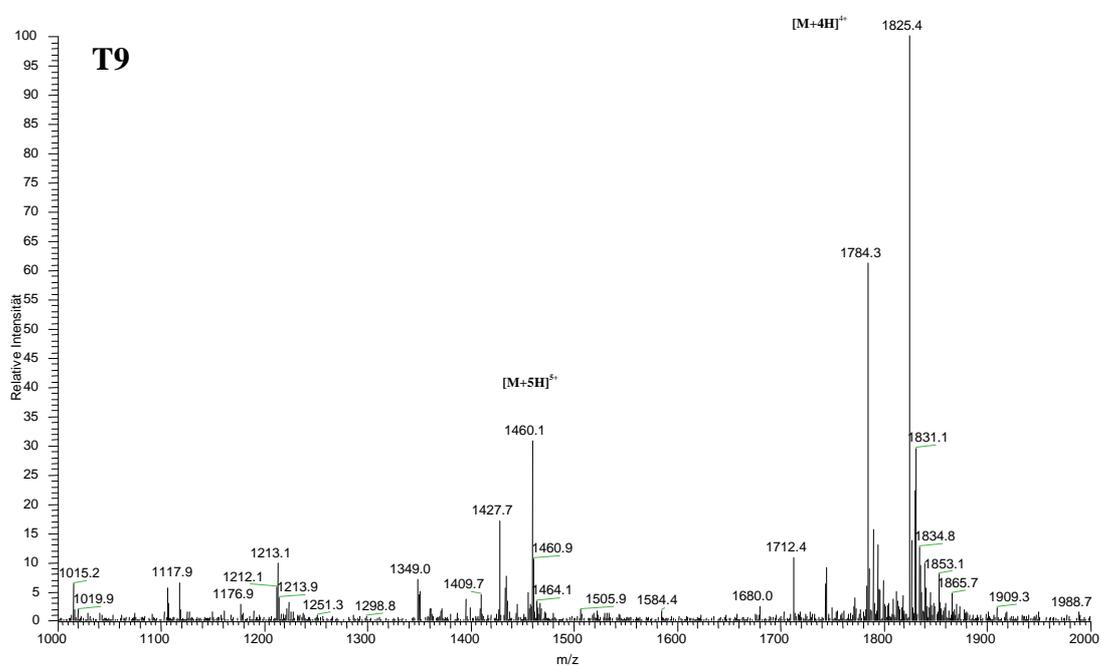
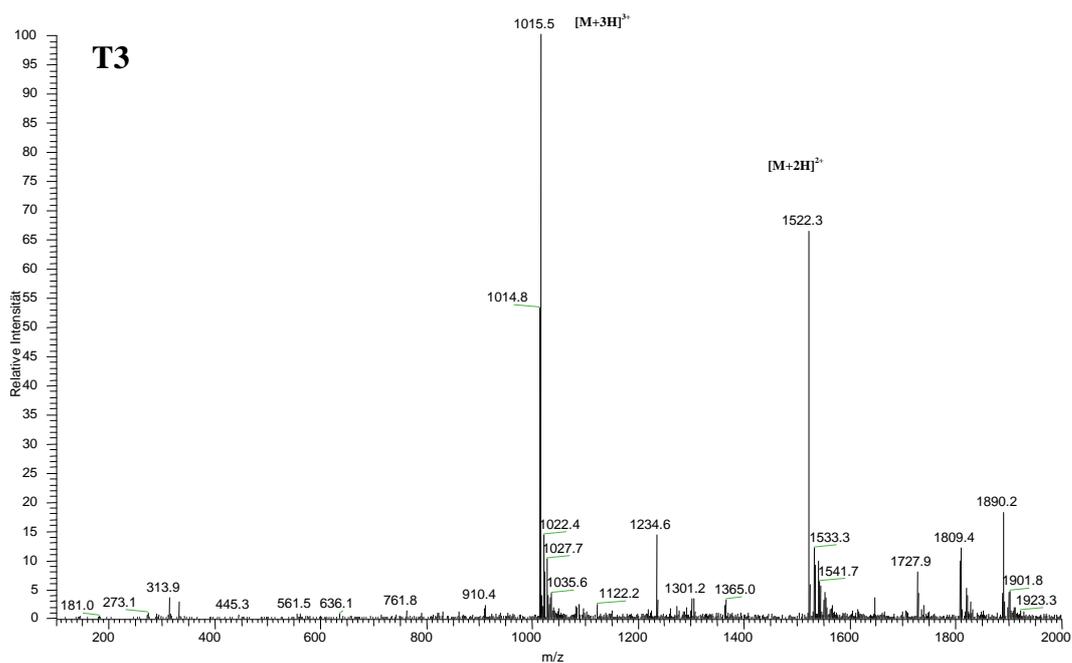
Volumenänderung der Protoplasten aus, die der Auxin-induzierten Antwort analog war. Dagegen hemmte ein zweiter Antikörper, gerichtet gegen den C-Terminus von AtERabp1, die Auxin-induzierte Schwellantwort. Ein C-terminales Peptid, abgeleitet aus der ZmERabp1 Primärsequenz, löste eine Auxin-analoge Schwellantwort aus.

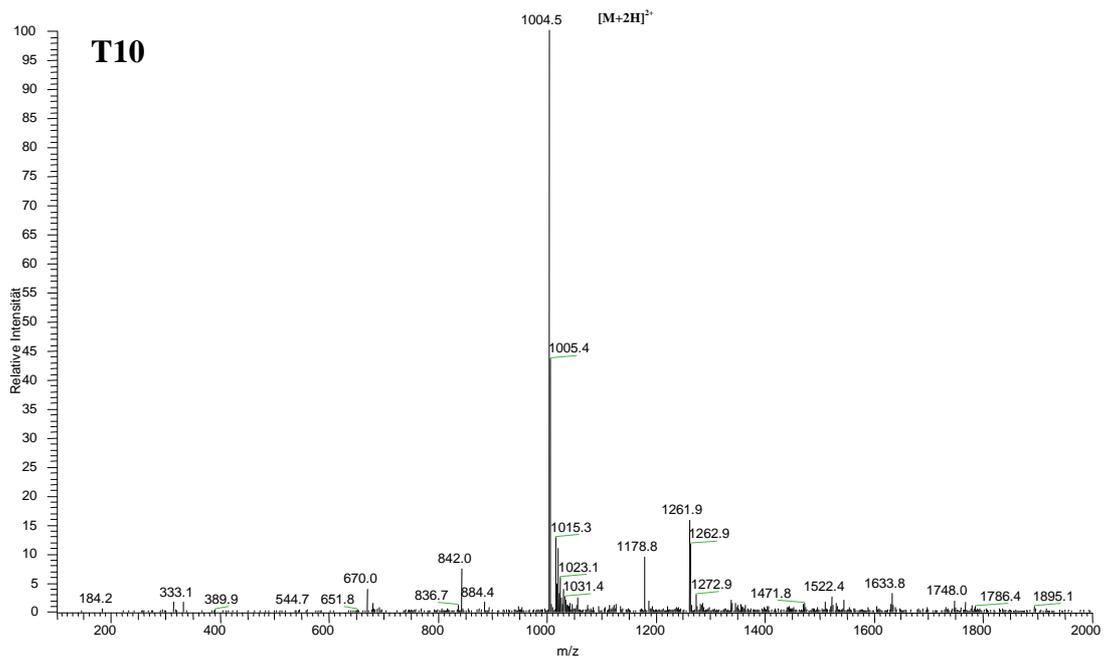
6

Anhang









Anhang 1: Massenspektrometrische Analyse eines tryptischen Verdaus von derivatisiertem (4-Vinylpyridin/Iodacetamid) ZmERabp1. Dargestellt sind die in Abb. 13 nicht aufgeführten Massenspektren der tryptischen Peptide T5, T2, T8, T4, T3, T9 und T10.

7 Literatur

- Abel, S. und Theologis, A. (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.*, **111**, 9-17.
- Anai, T., Miyata, M., Kosemura, S., Yamamura, S., Tsuge, T., Matsui, M., Uchida, H. und Hasegawa, K. (1997) Comparison of *abp1* primary sequences from monocotyledonous and dicotyledonous species. *J. Plant Physiol.*, **151**, 446-449.
- Assmann, S. M. (1993) Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 345-375.
- Bandurski, R. S., Cohen, J. D., Slovin, J. P. und Reinecke, D. M. (1995) Auxin biosynthesis and metabolism. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 39-65.
- Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G., Klämbt, D., Ghislain, M. und Guern, J. (1989) Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 891-895.
- Baron-Epel, O., Charyal, P. K. und Schindler, M. (1988) Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta*, **191**, 330-341.
- Bartel, B. und Fink G. R. (1994) Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6649-6653.
- Bartel, B. (1997) Auxin biosynthesis. Jones, R. L.: Ed. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 51-66.
- Bates, G. W. und Goldsmith, M. H. M. (1983) Rapid response of the plasma-membrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids. *Planta*, **159**, 231-237.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. und Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-50.
- Benning, C. (1986) Evidence supporting a model of voltage-dependent uptake of auxin into *Cucurbita-pepo* vesicles. *Planta*, **169**, 228-237.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, **70**, 241- 250.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. J. und Gotschlich, E. C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.*, **136**, 175-179.
- Blatt M. R. und Thiel, G. (1994) K⁺ channels of stomatal guard cells: Bimodal control of the K⁺ inward-rectifier evoked by auxin. *Plant J.*, **5**, 55-68.
- Bonner, J. (1933) The action of the plant growth hormone. *J. Gen. Physiol.*, **63**, 63-76.

- Bourque J. E. (1995) Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci.*, **105**, 125-149.
- Bronsema, F. B. F., Van Oostveen, W. J. F. und Van Lammeren, A. A. M. (1998) Immunocytochemical localisation of auxin-binding proteins in coleoptiles and embryos of *Zea mays* L. *Protoplasma*, **202**, 65-75.
- Brown, J. C. und Jones, A. M. (1994) Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein 1. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21136-21140.
- Burlingame, A. L. (1993) Mass spectrometry in protein sequence and structural investigations. Angeletti, R. H.: Ed. *Techniques in protein chemistry IV*, 3-21, Academic Press, Inc., New York.
- Cande, W. Z. und Ray, P. M. (1976) Nature of cell-to-cell transfer of auxin in polar transport. *Planta*, **129**, 43-5.
- Chen, J.-G., Ullah, H., Im, K.-H., Young, J. C. und Jones A. M. (2000) *Arabidopsis* auxin-binding protein 1 gene knockout is embryo lethal. P-4.1, *EMBO Workshop on Auxin*, France.
- Christie, A. E. und Leopold, A. C. (1965) On the manner of triiodobenzoic acid inhibition of auxin transport. *Plant Cell Physiol.*, **6**, 337-345.
- Crestfield, A. M., Moore, S. und Stein, W. H. (1962) The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **238**, 622-627.
- Chuang, C.-F. und Meyerowitz E. M. (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4985-4990.
- Cleland R. E. (1995) Auxin and cell elongation. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 214-227.
- Cohen, J. D. und Bandurski, R. S. (1982) Chemistry and biology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 403-430.
- Darwin, C. und Darwin, F. (1881) *The power of movements in plants. Darwins gesammelte Werke Bd. 13*, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Davies P. J. (1995) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-12.
- Davies, P. J., Doro, A. und Tarbox, A. W. (1976) The movement and physiological effect of indoleacetic acid following point applications to root tips of *Zea mays*. *Physiol. Plant.*, **36**, 333-337.

- De Bernadez Clark, E., Schwarz, E. und Rudolph, R. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzym.*, **309**, 217-236.
- del Pozo, J. C., Timppte, C., Tan, S., Callis, J. und Estelle, M. (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science*, **280**, 1760-1763.
- Dohrmann, U., Hertel, R. und Kowalik, W. (1978) Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta*, **140**, 97-106.
- Eftink, M. R. (1997) Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzym.*, **278**, 221-257.
- Epel, B. L., Warmbrodt, R. P. und Bandurski, R. S. (1992) Studies on the longitudinal and lateral transport of IAA in the shoots of etiolated corn seedlings. *J. Plant Physiol.*, **140**, 310-318.
- Ephritikhine, G., Barbier-Brygoo, H., Muller, J.F. und Guern, J. (1987) Auxin effect on the transmembrane potential difference of wild-type and mutant tobacco protoplasts exhibiting a differential sensitivity to auxin. *Plant Physiol.*, **83**, 801-804.
- Feckler, C. (1997) *Analyse des Auxin-bindenden Proteins AtERabp1 aus Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Felle, H., Peters, W. and Palme, K. (1991) The electrical response of maize to auxins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1064**, 199-204.
- Fischer, C., Lüthen, H., Böttger, M. and Hertel, R. (1992) Initial transient growth inhibition in maize coleoptiles following auxin application. *J. Plant Physiol.*, **141**, 88-92.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. und Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**, 2226-2230.
- Gehring, C. A., Irving, H. R. und Parish, R. W. (1990) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9645-9649.
- Gehring, C. A., McConchie, R. M., Venis, M. A. und Parish, R. W. (1998) Auxin-binding-protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH. *Planta*, **205**, 581-586.
- Goldsmith, M. H. M. (1977) The polar transport of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 439-478.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Frenza, B. R. und Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1720-1730.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H. und Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane proton ATPase. *Planta*, **185**, 527-537.

- Henderson, J., Bauly, J. M., Ashford, D. A., Oliver, S. C., Hawes, C. R., Lazarus, C. M., Venis, M. A. und Napier, R. M. (1997) Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: Quantifying escape and the role of auxin. *Planta*, **202**, 313-323.
- Hertel, R., Thomson, K. S. und Russo, V. E. A. (1972) In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta*, **107**, 325-340.
- Hertel, R., Lomax, T. L. und Briggs, W. R. (1983) Auxin transport in membrane vesicles from *Curcubita pepo* L., *Planta*, **157**, 757-759.
- Hesse, T., Feldwisch, J., Balshuesemann, D., Bauw, G., Puype, M., Vandekerckhove, J., Löbler, M., Klämbt, D., Schell, J. und Palme, K. (1989) Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* L. coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *EMBO J.*, **8**, 2453-2462.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependant protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
- Inohara, N., Shimomura, S., Fukui, T. und Futai, M. (1989) Auxin-Binding Protein Located in the Endoplasmic Reticulum of Maize Shoots Molecular Cloning and Complete Primary Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3564-3568.
- Jacobs, M. und Rubery, P. H. (1988) Naturally Occurring Auxin Transport Regulators. *Science*, **241**, 346-349.
- Jones, A. M., Im, K. H., Savka, M. A., Wu, M. J., DeWitt, N. G., Shillito, R. und Binns, A. N. (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science*, **282**, 1114-7.
- Keller, C.P. und Van Volkenburgh, E. (1996) Osmoregulation by oat coleoptile protoplasts. *Plant Physiol.*, **110**, 1007-1016.
- Kim, J., Harter, K. und Theologis, A. (1997) Protein-protein interactions among Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11786-11791.
- Klämbt, D. (1990) A View about the function of auxin-binding proteins at plasma membranes. *Plant Mol. Biol.*, **14**, 1045-1050.
- Kögl, F. und Kostermans, D. G. F. R. (1934) Hetero-Auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 113-121.
- Krautwig, B. (1993) *Etablierung von in vitro-Kultursystemen aus Mikrosporen von Mais (Zea mays L.)*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Kutschera, U. (1994) Tansley Review No. 66: The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytologist*, **126**, 549-569.

- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lackmann, M., Bucci, T., Mann, R. J., Kravets, L. A., Viney, E., Smith, F., Moritz, R. L., Carter, W., Simpson, R. J., Nicola, N. A., Mackwell, K., Nice, E. C., Wilks, F. A. und Boyd, A. W. (1996) Purification of a ligand for the EPH-like receptor HEK using a biosensor-based affinity detection approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2523-2527.
- Lazarus, C. M. und Macdonald, H. (1996) Characterization of a strawberry gene for auxin-binding protein, and its expression in insect cells. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 267-277.
- Leblanc, N., Roux, C., Pradier, J. M. und Perrot Rechenmann, C. (1997) Characterization of two cDNAs encoding auxin-binding proteins in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.*, **33**, 679-689.
- Leblanc, N., Perrot-Rechenmann, C. und Barbier-Brygoo, H. (1999a) The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. *FEBS Lett.*, **449**, 57-60.
- Leblanc, N., David, K., Grosclaude, J., Pradier, J. M., Barbier-Brygoo, H., Labiau, S. und Perrot-Rechenmann, C. (1999b) A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28314-20.
- Lembi, C. A., Morre, D. J., Thompson, K.-S. und Hertel, R. (1971) N-1-Naphthylphthalamic-acid-binding activity of plasma membrane-rich fraction from maize coleoptiles. *Planta*, **99**, 37-45.
- Leyser, H. M. O., Lincoln Cynthia, A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J. und Estelle, M. (1993) Arabidopsis auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, **364**, 161-164.
- Löbler, M. und Klämbt, D. (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn *Zea mays* cultivar Mutin 1. Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**, 9848-9853.
- Lomax, T. L., Muday G. K. und Rubery, P. H. (1995) Auxin transport. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 509-530.
- Lüthen, H., Bigdon, M. and Böttger, M. (1990) Reexamination of the acid growth theory of auxin action. *Plant Physiol.*, **93**, 931-939.
- Lüthen, H. und Böttger, M. (1992) A high-tech low-cost auxanometer for high-resolution determination of elongation rates in six simultaneous experimental setups. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg*, **24**, 13-22.
- Lüthen, H., Claussen, M. and Böttger, M. (1999) Growth: Progress in auxin research. *Prog. Bot.*, **60**, 315-340.

- Marten, I., Lohse, G. und Hedrich, R. (1991) Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *Nature*, **353**, 758-762.
- Macdonald, H. (1997) Auxin perception and signal transduction. *Physiol. Plant.*, **100**, 423-430.
- McNally, J. G., Karpova, T., Cooper, J. und Conchello, J. A. (1999) Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods*, **19**, 373-385.
- Mohrs, M. (1998) *Charakterisierung eines Transaktivationsystems in Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J. und Palme, K. (1998) A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 376-381.
- Morris, D. A., Rubery, P. H., Jarman, J. und Sabater, M. (1991) Effects of inhibitors of protein synthesis on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo* L. hypocotyl segments. *J. Exp. Bot.*, **42**, 773-784.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. und Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.*, **17**, 6903-6911.
- Napier, R. M., Venis, M. A., Bolton, M. A., Richardson, L. I. und Butcher, G. W. (1988) Preparation and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to maize membrane auxin-binding protein. *Planta*, **176**, 519-526.
- Napier, R. M., Fowke, L. C., Hawes, C., Lewis, M. und Pelham, H. R. B. (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, **102**, 261-271.
- Napier, R. M. und Venis, M. A. (1995) Tansley review no. 79 auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytologist*, **129**, 167-201.
- Napier, R. M., Baulcy, J. M., Chen, J.-G., Marshall, J., Woo, E. J., Venis, M. A. und Pickersgill R. W. (2000) An auxin-specific recognition site, P-4.11, *EMBO Workshop on Auxin*, France.
- Neuhoff, V., Stamm, R. und Eibl, H.J. (1985) Clear background and high sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**, 427-448.
- Ohwaki, Y. und Tsurumi, S. (1976) Auxin transport and growth in intact roots of *vicia faba*. *Plant Cell Physiol.*, **17**, 1329-1342.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. und Shimura, Y. (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant*

- Cell*, **3**, 677-684.
- Oliver, M. J., Ferguson, D. L., Burke, J. J. und Velten, J. (1993) Inhibition of tobacco NADH-hydroxypyruvate reductase by expression of a heterologous antisense RNA derived from a cucumber cDNA: Implications for the mechanism of action of antisense RNAs. *Mol. Gen. Genet.*, **239**, 425-434
- Palme, K., Hesse, T., Campos, N., Garbers, C., Yanofsky, M. F. und Schell, J. (1992) Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **4**, 193-201.
- Pelham, H. R. B. (1988) Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.*, **7**, 913-918.
- Phizicky, E. M. und Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.*, **59**, 94-123.
- Radermacher, E. und Klämbt, D. (1993) Auxin dependent growth and auxin-binding proteins in primary roots and root hairs of corn (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.*, **141**, 698-703.
- Ray, P. M. (1977) Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites of auxin action. *Plant Physiol.*, **60**, 585.
- Ray, P. M. und Dohrmann U. (1977) Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile Tissue. *Plant Physiol.*, **59**, 357-364.
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L. und Zerner, B. (1979) Ellman's reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) -a reexamination. *Anal. Biochem.*, **94**, 75-81.
- Rubery, P. H. (1987) Auxin Transport. Davies, P. J.: Ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 90-247.
- Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G. und Estelle, M. (1997) Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell*, **9**, 745-757.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Santoni, V., Vansuyt, G. und Rossignol, M. (1990) Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane proton-ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.*, **68**,

33-38.

- Shimomura, S., Sotobayashi, T., Futai, M. und Fukui, T. (1986) Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *J. Biochem.*, **99**, 1513-1524.
- Sieburth, L. E. und Meyerowitz, E. M. (1997) Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell*, **9**, 355-365.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic-acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Steffens, B. und Lüthen, H. (2000) New methods to analyse auxin-induced growth. II. The swelling reaction of protoplasts - a model system for the analysis of auxin signal transduction? *Plant Growth Reg.*, in press.
- Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Böttger, M. und Lüthen, H. (2000) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J.* (eingereicht).
- Sze, H., Li, X. und Palmgren, M. G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, **11**, 677-689.
- Temple, S. J., Knight, T. J., Unkefer, P. J. und Sengupta-Gopalan, C. (1993) Modulation of glutamine synthetase gene expression in tobacco by the introduction of an alfalfa glutamine synthetase gene in sense and antisense orientation: Molecular and biochemical analysis. *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 315-325.
- Thiel, G., Blatt, M. R., Fricker, M. D., White, I. R. und Millner, P. (1993) Modulation of K⁺ channels in *Vicia* stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11493-11497.
- Thornton, J. M. (1981) Disulfide bridges in globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **151**, 161-287.
- Tietze-Haß, E. und Dörffling, K. (1977) Initial phases of indolylacetic acid induced growth in coleoptile segments of *Avena sativa* L. *Planta*, **135**, 192-195.
- Tillmann, U., Viola, G., Kayser, B., Siemeister, G., Hesse, T., Palme, K., Löbler, M. und Klämbt, D. (1989) Complementary Dna Clones of the Auxin-Binding Protein From Corn Coleoptiles *Zea mays* L. Isolation and Characterization By Immunological Methods. *EMBO J.*, **8**, 2463-2468.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretical transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Tsurumi, S. und Ohwaki, Y. (1978) Transport of ¹⁴C-labeled indoleacetic acid in *Vicia* root segments. *Plant Cell Physiol.*, **19**, 1195-1206.

- Ulmasov, T., Hagen, G. und Guilfoyle, T. J. (1997a) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, **276**, 1865-1868.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. und Guilfoyle Tom, J. (1997b) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971.
- Venis, M. A., Thomas, E. W., Barbier Brygoo, H., Ephritikhine, G. und Guern, J. (1990) Impermeant Auxin Analogues Have Auxin Activity. *Planta*, **182**, 232-235.
- Venis, M. A., Napier, R. M., Barbier Brygoo, H., Maurel, C., Perrot Rechenmann, C. und Guern, J. (1992) Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7208-7212.
- Venis, A. M. und Napier, R. M. (1995), Auxin receptors and auxin binding proteins. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **14**, 27-47.
- Vesper, M. J. und Kuss, C. L. (1990) Physiological evidence that the primary site of auxin action in maize coleoptiles is an intracellular site. *Planta*, **182**, 486-491.
- Watanabe, S. und Shimomura, S. (1998) Cloning and expression of two genes encoding auxin-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 63-74.
- Went, F. W. (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Rec. Trav. Bot. Néérl.*, **25**, 1-116.
- Went, F. W. und Thiemann, K. V. (1937) *Phytohormones*. New York, McMillan.
- Wetzel, R. (1987) Harnessing disulfide bonds using protein engineering. *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 478-482.

Kurzzusammenfassung

Die AtERabp1-Expression ist sowohl anhand von Northern- und Western-Blot-Analysen eingehend charakterisiert worden. Durch Immunlokalisation wurde die AtERabp1-Expression in Wurzeln und Embryonen untersucht. Unter Verwendung eines aktivierbaren Promotors konnte die Transkriptmenge von *AtERabp1* in *A. thaliana* Pflanzen verändert werden. Allerdings hatte dies keinen Einfluß auf die Proteinexpression bzw. resultierte nicht in einem sichtbaren Phänotyp der transgenen Pflanzen. ZmERabp1 wurde aus Maiskoleoptilen isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Die molekulare Masse beträgt 20243 Da; der Glykanrest liegt in der mannosereichen Form vor. Ferner wurde durch zwei unabhängige Experimente die Lage einer Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys61 identifiziert. Für die Gewinnung großer Mengen von rekombinant exprimiertem AtERabp1 wurde eine Renaturierungsmethode entwickelt. Unter Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie wurden die Dissoziationskonstanten des 1-NAA- und 2-NAA-Protein-Komplexes bestimmt (2.3×10^{-6} M bzw. 3×10^{-7}). Mit Hilfe eines neu etablierten Systems ist es gelungen, ZmERabp1 funktionell zu charakterisieren. Isolierte Maisprotoplasten wurden mit Antikörpern gegen AtERabp1 sowie einem C-terminalen Peptid, abgeleitet aus der ZmERabp1 Primärsequenz, inkubiert und die Volumenänderung der Protoplasten untersucht.

Abstract

Expression of AtERabp1 was characterized in detail by northern- and western-blot analysis. Immunolocalization studies were performed on root and embryo tissue. Making use of a transcription activation system the level of *AtERabp1* transcript was manipulated in *A. thaliana* plants without any effect on the protein expression level or a visible phenotype. ZmERabp1 was structurally characterized. The molecular mass of ZmERabp1 was determined to be 20243 Da comprising a sugar moiety corresponding to a high mannose type glycan structure. The position of a disulfide bridge was localized between Cys2 and Cys61. The residue Cys155 bears the free sulfhydryl group. A method was developed for the renaturation of recombinantly expressed AtERabp1. Refolded AtERabp1 was analyzed by means of fluorescence spectroscopy. Dissociation constants of 1-NAA and 2-NAA were determined to 2.3×10^{-6} M and 3×10^{-7} M, respectively. ZmERabp1 has been functionally characterized. Maize protoplasts were incubated with antibodies against AtERabp1 and with a C-terminal peptide deduced from the primary sequence of ZmERabp1. The volume changes of the protoplasts were analyzed.

Lebenslauf

Name	Christian Feckler
Geburtsdatum	31.08.1970
Geburtsort	Wissen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung:

1977-1981	Grundschule in Brachbach
1981-1990	Gymnasium in Siegen
1990-1992	Studium der Biologie an der Universität zu Köln (Vordiplom)
1990-1996	Studium der Chemie an der Universität zu Köln
Dezember 1996	Diplomprüfung in Chemie
1997	Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft in Köln unter der Anleitung von PD Dr. K. Palme. Thema: Analyse des Auxin-bindenden Proteins AtERabp1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .
1997-2000	Promotionsstudium an der Universität zu Köln. Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft in Köln unter der Anleitung von PD Dr. K. Palme.

Köln, 29.11.2000

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Schomburg betreut worden.

Es liegen keine Teilpublikationen vor.

Köln, 29.11.2000

Danke

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Klaus Palme danke ich für das facettenreiche Thema und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Sowohl seine wissenschaftliche Anleitung als auch der zugestandene Freiraum waren die Grundlagen zum Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg danke ich für die offizielle Betreuung dieser Arbeit; Herrn Prof. Dr. Hansjörg Schneider-Poetsch danke ich für die Bereitschaft, den Vorsitz der Disputation zu übernehmen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere den Kollegen im kleinen Labor/Büro, danke ich für die Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Birgit Reintanz, Herrn Dr. Matthias Godde und Herrn Dr. Jochen Winter danke ich für die kritische Durchsicht der Dissertation und vieler praktischer Hilfen. Herrn Dr. Gerhard Muster und Herrn Dr. David Rouquie danke ich für die Unterstützung und Ratschläge in biochemischen Fragen.

Frau Petra Tänzler danke ich herzlich für die unermüdliche Suche nach einer *knock-out*-Pflanze und die Organisation des Laboratoriums.

Dank gebührt Herrn Alexander Szyroki für die Etablierung des Insektenzellsystems sowie für die vielen anregenden Diskussionsrunden.

Frau Michaela Lehnen danke ich für die Hilfe bei Klonierungen.

Bei Herrn Dr. Axel Römer und Herrn Dr. Werner Feser möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die große Hilfe bei der massenspektrometrischen Analyse bedanken.

Der AG Böttger (Bianka Steffens, May Christian, Dr. Hartwig Lüthen und Prof. Dr. Michael Böttger) danke ich für die erfolgreiche Kooperation bezüglich der funktionellen Studien.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph möchte ich mich für die freundliche Einladung nach Halle in sein Laboratorium bedanken. Herrn Dr. Hauke Lilie gilt mein Dank für die Einführung in die Rückfaltungstechnik sowie für viele ergänzende Ratschläge.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir den nötigen Rückhalt und Ausgleich während dieser Arbeit gaben.

Dieses Ding wird die zweite Cheopspyramide sein:
ein Klotz, der herumliegt und niemandem nutzt.
Erwin Chargaff

Wenn das Humangenomprojekt abgeschlossen sein wird,
wird es in unserer Macht stehen,
die grundlegenden Eigenschaften zu erkennen,
die uns zu Menschen machen.
James D. Watson

Eine genetisch deterministische Sicht des Lebens
ist ein sehr vereinfachter, überaus naiver Blick auf ein Extrem.
Das sind solche Beispiele,
wo Menschen die Wissenschaft aus Hollywood-Filmen lernen,
anstatt von Wissenschaftlern.
Craig J. Venter

Dieser Erkenntnisgewinn hat für das Selbstverständnis des Menschen einen ähnlichen Stellenwert
wie die Verdrängung des ptolomäischen durch das kopernikanische Weltbild
und ist in seinen Auswirkungen mit Sicherheit ein weitaus größerer Sprung für die Menschheit,
als die Mondlandung.
Hans Lehrach

Das eigentliche Problem aber besteht nach wie vor darin,
daß weder die Funktion noch die Arbeitsweise von Proteinen
ausreichend erschlossen sind - davon wissen wir allenfalls ein Zehntel.
Und solange man diese Dinge nicht weiß,
wird die Entschlüsselung des Genoms vor allem von theoretischem Nutzen sein.
Günter Blobel