

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren lieferten die Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck. Chemikalien für Kulturmedien wurden bei den Firmen Difco Lab. (Detroit, USA) und Sigma bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Eurogentec (Seraing, Belgien) und Promega (Madison, USA) geliefert. Es wurden Röntgenfilme der Firma Kodak (Rochester, USA) benutzt. Oligonukleotide wurden über die Firma MWG-Biotech (München) bezogen. Die Nukleotidsequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang 1 aufgeführt. Monoklonale HA-Antikörper der Firma Babco (San Francisco, USA) wurden über die Firma Eurogentec bezogen. Anti-ActiveTM-MAPK-Antikörper lieferte die Firma Promega.

2.2 Kultivierung, Behandlung und Aufarbeitung der Petersiliezellen und Petersilieprotoplasten

Zellsuspensionskulturen der Petersilie (*Petroselinum crispum*) wurden in modifiziertem Gamborgs B5-Medium mit 1 mg l⁻¹ 2,4-D im Dunkeln bei 26°C geschüttelt und alle 7 Tage in frisches Medium überführt (Hahlbrock, 1975).

2.2.1 Gewinnung von Petersilieprotoplasten

Protoplasten wurden nach der Methode von Dangl *et al.* (1987) unter Verwendung 5 Tage alter Zellkulturen isoliert.

2.2.2 Elicitorbehandlung der Petersiliezellen

Für Elicitierungsexperimente wurden 6 Tage alte Zellen durch Filtration geerntet, mit I-Medium gewaschen und anschließend in I-Medium (10 mM Mes pH 5,7, 4% B5-Medium, 3% Saccharose) resuspendiert (100 g FG l⁻¹). Nach 30 min Äquilibrieren im Dunkeln unter konstantem Schütteln wurde die Suspension mit wässriger Elicitorstammlösung versetzt. Für Pep25 (Sequenz: DVTAGAEVWNQPVRGFKVYE-QTEMT) wurde eine Stammlösung von 10 µg/ml verwendet, für Pep13 (Sequenz: VWNQPVRGFKVYE) und die Pep13-Analoga eine 10 µM Lösung (Nürnberger *et al.*, 1994).

Zur Untersuchung der Inhibitorwirkung verschiedener Substanzen wurde die Zellsuspension mit 0.1% 1000fach konzentrierten Stammlösungen der Verbindungen (in

DMSO) versetzt und vor Zugabe des Elicitors für 30 min vorinkubiert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Elicitorbehandlung durch Filtration geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In gleich behandelten Proben wurden nach 24 h die Furanocumarinphytoalexine bestimmt (Parker *et al.*, 1991).

2.2.3 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium

Die Menge der durch die Zellen oder Protoplasten gebildeten Furanocumarinphytoalexine wurde nach 24 h Elicitorbehandlung anhand der Fluoreszenz des Kulturmediums (360 nm Excitation /440 nm Emission) bestimmt (Cytofluor II, Bioserch, Bedford, USA) (Parker *et al.*, 1991).

2.2.4 Proteinextraktion aus Petersiliezellen

Gefrorene Petersiliezellen (100 µg) wurden mit 200 µl Kinaseextraktionspuffer (Tab.1) versetzt und mit einem Glasstab aufgeschlossen. Nach 15 min Zentrifugation (4°C, 15000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und direkt für Immunpräzipitations-Kinaseexperimente verwendet oder bei -80°C eingefroren.

Tab. 1: Zusammensetzung des Kinaseextraktionspuffers

Kinaseextraktionspuffer	25 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	75 mM	NaCl
	15 mM	EGTA
	15 mM	Glycerophosphat
	15 mM	4-Nitrophenylphosphatbis[Tris]
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	1 mM	NaF
	0,5 mM	Na ₃ VO ₄
	0,5 mM	PMSF
	10 µg/ml	Leupetin
	10 µg/ml	Aprotenin
	0,1%	Tween

2.2.5 Transiente Transformation von Petersilieprotoplasten

Protoplasten wurden entsprechend der Methode von Dangl *et al.* (1987) mit 25 µg Plasmid (10 µg Reporterplasmid, 10 µg Effektorplasmid und 5 µg Standardisierungsplasmid) transformiert. Dabei wurden die Reporterkonstrukte PR1.1- (van de Löcht *et al.*, 1990) und PR2-GUS (Rushton *et al.*, 1996) aus dem *E. coli*-Stamm GM2163 (Woodcock *et al.*, 1989) gewonnen, da die basale und induzierte GUS-Expression in Petersilieprotoplasten stark durch den bakteriellen Wirtstamm bzw. den Methylierungsgrad der Reporterplasmide bestimmt wird (Torres *et al.*, 1993). In jedem Experiment wurden vier bis fünf parallele Transformationen pro Effektorkonstrukt durchgeführt. Im einzelnen waren folgende Arbeitsschritte erforderlich:

In Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (14 ml “round bottom tubes“; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) wurden 200 µl PEG-Lösung (25% PEG₆₀₀ (Serva), 450 mM Mannitol, 100 mM CaCl₂), 40 µl Plasmidlösung (25 µg Plasmid in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA)) und 200 µl Protoplastensuspension (1x10⁶ Protoplasten/ml in B5-Saccharose (0,4 M Saccharose, 3,2 g/l Gamborgs B5-Medium (Sigma), 0.1 mg/l 2.4-D) zusammengegeben und leicht geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden 5 ml 0,275 M Ca(NO₃)₂ zugegeben und die Protoplasten anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (7 min, 800 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 6 ml B5-Saccharose resuspendiert. Die einzelnen Transformationsansätze wurden zweigeteilt und nach 8 h wurde die eine Hälfte mit Wasser, die andere Hälfte mit Pep25 (50 ng/ml) versetzt. Nach weiteren 14 h wurden die Protoplasten in 25 ml 0,24 M CaCl₂ gegeben und in 2 aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (10 min, 2000 rpm, in 50 ml Röhrchen; 30 s, 10000 rpm, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen) geerntet und bei -80°C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

Molekularbiologische Standardmethoden, die im folgenden nicht einzeln erwähnt sind, wurden, wie in Sambrock *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt.

2.3.1 Bakterienstämme, Phagen, Plasmide

Für molekularbiologische Arbeiten wurden die folgenden *E. coli*-Stämme (Tab. 2), Plasmide (Tab. 3) und Phagen (Tab. 4) verwendet:

Tab. 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stämme	Referenz
DH5α	Invitrogen, (San Diego, USA)
JM109	Promega
BMH 71-18 <i>mutS</i>	Promega
BL21	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
XL1-Blue-MRF ⁺	Stratagene (La Jolla, USA)
XLOLR	Stratagene
GM2163	Woodcock <i>et al.</i> (1989)

Tab. 3: Verwendete Plasmidvektoren

Plasmide ¹	Charakteristika	Wirt	Referenz
PUC18/19	<i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r	DH5 α	Invitrogen
pBluescript SK ⁻	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r	DH5 α	Stratagene
pGEM-T	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , SP6 und T-Promotor	DH5 α , JM109	Promega
pGEX-5X-2	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , <i>lacI^q</i> , <i>tac</i> -Promotor, RBS, <i>GST</i>	DH5 α , BL21	Pharmacia
pGEX-2T-2	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , <i>lacI^q</i> , <i>tac</i> -Promotor, RBS, <i>GST</i>	DH5 α , BL21	Pharmacia
pRT100	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , CaMV-35S-Promotor, Nos-Terminator	DH5 α	Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pBT4	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , CaMV-35S-Promotor, Nos-Terminator	DH5 α	Feldbrügge <i>et al.</i> (1994)
PR1.1-GUS	PUC9, PR1.1-Promotorfragment (840 bp), <i>GUS</i>	GM2163	Rushton <i>et al.</i> (1996)
PR2-GUS	PUC9, PR2-Promotorfragment (125 bp), <i>GUS</i>	GM2163	van de Löcht <i>et al.</i> (1990)

¹ Die für das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendeten Plasmidvektoren sind unter 2.7.1 aufgeführt

Tab. 4: Verwendete Phagen

Phagen	Charakteristika	Wirt	Referenz
Lambda ZAP TM II	λ -Derivat, Excision, von pB SK ⁻	XL1-Blue-MRF'	Stratagene
Lambda HybriZAP TM	λ -Derivat, Excision, von pAD-GAL4	XL1-Blue-MRF'	Stratagene
ExAssist TM	M13-Derivat, <i>amber</i> Mutation	XL1-Blue-MRF'	Stratagene
R480	M13-Derivat, <i>amber</i> Mutation	JM109	Promega

2.3.2 Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von "QUIAprepTM"-Säulen der Firma Quiagen (Hilden) nach Herstellerprotokollen aus Bakterien-Übernachtskulturen aufgereinigt.

2.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Bereiche, in denen sich die gewünschten Fragmente befanden, wurden ausgeschnitten und daraus mit Hilfe des "QIAquick™ gel extraction kit" der Firma Qiagen die DNA aufgereinigt.

2.3.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden unter Verwendung des "Megaprime DNA-labelling Kit" (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) und mit [α - 32 P]-dATP nach der "random prime"-Methode hergestellt. Nicht inkorporierte Radioaktivität wurde durch "Probe Quant™ G-50"-Säulen (Pharmacia) entfernt.

2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit "QIAquick™"-Zentrifugationssäulen (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend nach Angaben des Herstellers in den pGEM-T-Vektor (Pomega) kloniert.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen "DNA-Sequencer" (LICOR 4000L bzw. LONGREADER 4200, MWG-Biotech). Die Sequenzierreaktion wurde mit dem "SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing kit" (Epicentre Technologies; bezogen über BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf) oder dem "ThermiSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" (Amersham-Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für die Detektion der DNA-Fragmente besaßen die verwendeten Primer 5'-Fluoreszenzmarkierungen ("IRD800" bzw. "IRD700", MWG-Biotech).

2.3.7 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten

Sequenzdaten wurden mit dem Programm "DNASIS 2.1" (Hitachi, Tokyo, Japan) analysiert. Sequenzvergleiche mit Datenbanken wurden mit Hilfe von Programmen durchgeführt, die den BLAST-Algorithmus verwenden (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Dazu wurde der vom "National Centre for Biotechnological Information" (www.ncbi.nlm.nih.gov) und von der "Stanford Arabidopsis Database" (<http://genome-www.stanford.edu>) angebotene Service genutzt. Zur Abschätzung der Antigenizität von Peptidsequenzen wurden Programme verwendet, die auf den Methoden von Hoop und Woods (1981), Parker *et al.* (1986), Thornten *et al.*, (1986) und Welling *et al.* (1985) basieren.

2.3.8 Punktmutagenese

Die offenen Leserahmen von *MPK1*, 2, 3 und 4 wurden unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide amplifiziert (Anhang 1) und in den pGEM-T-Vektor kloniert (2.3.2). Unter Verwendung des "GeneEditor"-Kits (Promega) und 5'-phosphorylierter Oligonukleotide (Anhang 2) wurden nach Angaben des Herstellers die Punktmutationen in die Kinasesequenzen eingeführt.

Das "GeneEditor"-System basiert darauf, daß durch Verwendung zweier Oligonukleotide neben der gewünschten Mutation im Insert eine Mutation in das Ampizilinresistenzgen des Vektors eingeführt wird. Diese Mutation erzeugt eine zusätzliche Resistenz gegenüber der "GeneEditor"-Antibiotikum-Mischung (Promega) und ermöglicht so eine Selektion auf mutagenisierte Klone. Im einzelnen beinhaltet das Protokoll folgende Schritte:

Durch Infektion mit Helferphagen R408 (Promega) und unter Verwendung eines DNA-Reinigungskits für M13-Phagen ("QIAprepTM M13-System", Qiagen) wurde einzelsträngige DNA gewonnen. Anschließend wurden die Einzelstrang-DNA, ein Mutagenese-Oligonukleotid und das Selektions-Oligonukleotid in Annealingpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) für 5 min auf 75°C erhitzt und anschließend mit 1°C/min auf 30°C abgekühlt. Unter Verwendung von T4-DNA-Polymerase und T4-DNA-Ligase wurde ein Zweitstrang synthetisiert, der die Mutationen enthielt. Mit dem Reaktionsprodukt wurden *E. coli* BMH71-18 *mutS*-Zellen transformiert, die kein funktionierendes "DNA mismatch repair"-System besitzen (*mutS*) (Kramer *et al.*, 1984; Zell und Fritz, 1987) und somit den neu synthetisierten Strang nicht modifizieren. Nach Vermehrung und Selektion der Transformanten in Flüssigkultur, die "GeneEditor"-Antibiotikum-Mischung enthielt, wurde Plasmid-DNA isoliert. Anschließend wurden damit *E. coli* JM109-Zellen transformiert, mittels "GeneEditor"-Antibiotikum-Mischung positive Kolonien selektioniert und von Einzelkolonien Plasmid-DNA gewonnen. Durch automatische Sequenzierung wurde die Sequenz der Inserts bestimmt.

2.3.9 Konstruktion einer gerichteten cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Petersilie cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde unter Verwendung des "ZAP-cDNATM Synthesis Kit" und des "HybriZAPTM Two-Hybrid Predigested Vector Kit" der Firma Stratagene hergestellt. Dazu wurde RNA, wie von Logemann *et al.* (1987) beschrieben, aus unbehandelten und für 30, 60 und 120 min elicitorbehandelten Petersiliezellen gewonnen und vereinigt. Unter Verwendung des "poly(A)⁺RNA purification kit" der Firma Pharmacia wurde poly(A)⁺RNA angereichert und daraus mit Hilfe von oligo(dT) Primern, reverser Transkriptase und DNA-Polymerase cDNA synthetisiert. Nach einer Auffüllreaktion wurden EcoRI-Adaptoren anligiert, die cDNA mit XhoI verdaut und schließlich große Fragmente durch Sephacryl-S400 (Stratagene) angereichert. Die so entstandene cDNA wurde in die vorverdauten

Arme des HybriZAP™ λ -Phagen ligiert. Nach Reinigung der Phagen-DNA wurde diese mit "GigapackIII™ Gold"-Extrakt (Stratagene) verpackt und mit den erhaltenen Phagen XL1-Blue MRF' *E. coli*-Zellen infiziert.

Die Primärbank (3×10^6 pfu) wurde einmal amplifiziert; die resultierende Bank hatte einen Titer von $1,5 \times 10^9$ pfu/ml. Unter Verwendung des Helferphagen "EXAssist™" (Stratagene) und des *E. coli*-Stamms XL1-blue-MRF' wurde eine *In-Vivo*-Massen-Excision vorgenommen. Aus *E. coli*-XL1LR, die mit den dadurch erhaltenen filamentösen Phagen infiziert worden waren, wurde in einer Mega-Plasmidpräparation 2 mg cDNA-Bank-Plasmid isoliert.

2.3.10 Southernblots mit genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach der Methode von Dellaporte *et al.* (1983) aus Petersiliezellen isoliert und nach Restriktionsverdau in einem 0,7%igen Agarosegel (20 μ g/Spur) aufgetrennt. Das Gel wurde 15 min in 0,25 M HCl, 30 min in Denaturierungslösung (Tab. 5) und 2mal 15 min in Neutralisierungslösung (Tab. 5) inkubiert. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung von Saugpapier und 10xSSC (Tab. 5) auf Hybond-N-Membran (Amersham-Pharmacia Biotech) überführt und durch "UV-Crosslinking" (Stratalinker, Stratagene) immobilisiert. Nach 2stündiger Prähybridisierung bei 42°C in Prähybridisierungslösung (Tab. 5) wurde die Membran in Hybridisierungslösung, die zusätzlich zu Prähybridisierungslösung eine Hitze-denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt, überführt und 16 h bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 2mal mit Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1% SDS) (15 min, 42°C) und 2mal mit Waschlösung 2 (0,5xSSC, 0,1% SDS) (15 min, 68°C) gewaschen und schließlich autoradiographisch analysiert.

Tab. 5: Lösungen und Puffer für Southernblots

Denaturierungslösung:	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M	Tris/HCl, pH 7,2
	1,5 M	NaCl
	1 mM	EDTA
Prähybridisierungslösung:	50 %	Formamid
	5x	SSPE
	5x	Denhardts-Lösung
	1%	SDS
	100 μ g/ml	Herings-DNA (Serva)
20xSSPE	200 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	3 M	NaCl
	80 mM	EDTA
50xDenhardts-Lösung	10 g/l	Ficoll-400 (Pharmacia)
	10 g/l	Polyvinylpyrrolidon
	10 g/l	BSA (Serva)

2.3.11 Screening einer Petersilie- λ -ZAPTMII-cDNA-Bank

Für das Screening wurde eine gerichtete cDNA-Bank benutzt, die unter Verwendung des λ -ZAPTMII-Vectors und Poly(A)⁺-RNA von elicitorbehandelten (20 h) Petersiliezellen hergestellt worden war (W. Wirtz, 1994). Entsprechend einem Standardprotokoll wurden jeweils 5×10^5 pfu mit 0,6 ml Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue MRF' ausplattiert und nach 16stündiger Inkubation der Platten bei 37°C auf Nylonfilter (Porablot NYamp, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Nach Denaturierung der DNA mit Denaturierungslösung wurden die Filter mit Neutralisierungslösung neutralisiert, mit 2xSSC gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde durch "UV-Crosslinking" (Stratalinker, Stratagene) immobilisiert. Daraufhin wurden die Filter 2 h bei 42°C mit Prähybridisierungslösung (wie in 2.3.10 jedoch mit 25% Formamid) behandelt und für 16 h bei 42°C mit Hybridisierungslösung geschüttelt, die neben Prähybridisierungslösung (25% Formamid) eine Hitze-denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt. Anschließend wurden die Filter 2mal mit Waschlösung A (5xSSC, 0,1% SDS) und 2mal mit Waschlösung B (1xSSC, 0,1% SDS) gewaschen (jeweils 15 min bei 37°C) und autoradiographisch analysiert. Phagen im Bereich eines positiven Signals wurden in ein Gemisch aus 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform überführt. Nach einer zweiten Screening-Runde wurde das in den rekombinanten Phagen enthaltene pBluescript-SK-Plasmid durch *In-Vivo*-Excision (2.3.9) ausgeschnitten.

2.3.12 Bakterielle Expression von *MPK1*, 2, 3 und 4

Zur bakteriellen Expression von *MPK1*, 2, 3 und 4 wurden Vektoren der pGEX-Serie der Firma Pharmacia gewählt, die stromaufwärts des Polylinkers die Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) besitzen. Die Expressionsprodukte sind deshalb N-terminal mit GST fusioniert und lassen sich durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose-4B (Pharmacia) aufreinigen.

Die offenen Leserahmen von *MPK1*, 2, 3 und 4 wurden zur Einführung geeigneter Schnittstellen mittels PCR amplifiziert (Anhang 1) und in den pGEM-T-Vektor subkloniert. Von Einzelkolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Inserts mit korrekter DNA-Sequenz wurden in die Vektoren pGEX-5X-2 (*MPK1*) und pGEX-2T-2 (*MPK2*, 3 und 4) subkloniert. Positive Kolonien wurden durch Kolonienhybridisierung identifiziert und zur Gewinnung von Plasmid-DNA genutzt, die in der Folge durch Restriktionsanalyse untersucht wurde. Mit den so erhaltenen Plasmiden pGEX-M1, 2, 3, und 4 wurden *E. coli* BL21-Zellen transformiert.

Zur Proteinexpression wurden Übernachtskulturen der Bakterien 200fach in frischem LB-Medium (20% NaCl, 20% Pepton, 10% Hefeextrakt, 100 μ g/ml Ampicillin) verdünnt und unter starkem Schütteln (200 rpm) bei 30°C bis zu einer OD von 0,5-1 vermehrt. Zur Induktion der Proteinsynthese wurde 100 μ M IPTG zugegeben und anschließend weitere 3 h bei 30°C und starkem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10 min, 4°C, 5000 rpm) und durch Resuspendieren in B-PERTM-Reagenz (Pierce, Rockford USA) und anschließender Inkubation für 15 min bei

25°C aufgeschlossen. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 15000 rpm) sedimentiert und der Überstand mit Glutathion-Sepharose-4B (0,1% v/v) versetzt und 3 h bei 4°C geschüttelt. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation abgetrennt (2 min, 4°C, 2000 rpm) und durch Resuspendieren und anschließendes Zentrifugieren 5mal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 0,1% Tween 20) und 2mal mit 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurde durch 4 h Inkubation der Sepharose in Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM Glutathion (Sigma)) das rekombinante Protein eluiert. Die Abspaltung des GST-Anteils wurde durch 16 h Inkubation bei 4°C mit Thrombin (Sigma) (für MPK2. 3 und 4) oder Faktor X (Sigma) (für MPK1) durchgeführt. Dabei wurde jeweils 10 U Protease pro mg Fusionsprotein verwendet.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinproben wurde in einem Volumen von 100 µl nach der Methode von Bradford (1976) mit einem Fertigreagenz (Bio-Rad, München) bestimmt.

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Minigelapparaturen "Mighty Small" der Firma Hoefer (San Francisco, USA) wurden 10- bis 15%ige Polyacrylamidgele benutzt, die nach dem Protokoll von Laemmli (1970) hergestellt wurden. Die verwendeten Proteinextrakte wurden mit einem Volumen 2xProbenpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8, 8% Glycerin, 8% SDS, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und 3 min auf 95°C erhitzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine bei 40 mA wurden die Gele mit "Coomassie Blue G-250"-Lösung gefärbt, für Westernblots verwendet oder autoradiographisch untersucht.

2.4.3 Westernblots

Nach SDS-PAGE wurden Proteine durch "Semi-Dry"-Transfer mit einer Apparatur von BioTech Fischer (Reiskirchen) auf Nitrocellulosemembranen (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (Tab. 6) bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Membran über 2 h. Nach Trocknen der Membran wurden die Proteine durch Inkubation in "Fast Green"-Lösung (Pierce) und anschließendes Spülen in Wasser gefärbt. Nach Entfärben in 0,2 M NaOH wurde die Membran 14 h bei 4°C in "Blocking"-Puffer (Tab. 6) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 2 h bei RT mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in "Blocking"-Puffer inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 5mal 20 min mit TBST (Tab. 6) gewaschen und eine Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper (Boehringer, Mannheim) (8000fach verdünnt in "Blocking"-Puffer) inkubiert. Im Anschluß daran wurde 4mal 20 min mit

TBST und einmal 10 min mit TBS (Tab. 6) gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL⁺-System von Amersham entsprechend den Herstellerangaben.

Tab. 6: Puffer für Westernblots

Transferpuffer:	50 mM	Tris
	40 mM	Glycin
	0,04%	SDS
	20%	Methanol
TBST:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,1%	Tween 20
TBS	wie TBST, jedoch ohne Tween	
“Blocking“-Puffer	TBST mit 5% fettfreier Trockenmilch (BioRad, München) oder 5% BSA (Serva)	

2.5 Antikörperproduktion

2.5.1 Peptidsynthese

Peptide wurden durch Festphasensynthese unter Verwendung von Fmoc-Aminosäurederivaten, PyBOP (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) und eines “Economy Peptide Synthesizer EPS 221“ der Firma ABIMED (Langenfeld) synthetisiert. Nach 16stündiger Abspaltung der Reaktionsprodukte vom Syntheseharz (90% Trifluoressigsäure, 5% H₂O, 5% Trisilan) wurden die Peptide durch Zugabe eines 10fachen Überschusses 80%igen tert.-Butylesters präzipitiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde durch Reversed-Phase-HPLC mit einer Vydac C₄-Säule (22x250 mm; The Separations Group Hesperia, USA) auf einer HP1090-HPLC-Anlage (Hewlett-Packard, Böblingen) überprüft. Die Sequenz der Peptide wurde durch Peptidsequenzierung auf einem “Proteinsequencer G1000A“ (Hewlett Packard, Avondale, USA) bestimmt.

2.5.2 Gewinnung der Antiseren

Die für die Antikörperproduktion bestimmten Peptide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) an KLH (“key limpet hemocyanin“ aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*) gekoppelt und so für die Immunisierung von jeweils 2 Kaninchen pro Peptid verwendet. Dabei wurde ein Gemisch aus 500 µl Antigen- und 500 µl Adjuvantlösung intradermal an verschiedenen Stellen des Tiers injiziert. Die Injektionen wurden 14, 28 und 56 Tage nach der ersten Immunisierung wiederholt. Es wurde Blut vor der Immunisierung (2ml, Präimmenserum) und 38 (2 ml), 66 (22 ml) und 80 Tage (40 ml) nach der ersten Injektion entnommen.

2.6 In-Gel-MBP-Kinasenachweis

In einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel, das mit 0,3 mg/ml MBP (Myelin assoziiertes basisches Protein; Sigma) copolymerisiert worden war, wurden 15 µg Protein (2.3.4) pro Spur elektrophoretisch (40 mA) aufgetrennt (vgl. 2.4.2). Anschließend wurde das Gel zur Entfernung des SDS 4mal 20 min mit Puffer 1 (Tab. 7) gewaschen und dann 2mal 10 min in Puffer 2 (Tab. 7) äquilibriert. Daraufhin wurden die Proteine durch 1 h Schütteln in Denaturierungspuffer (Tab. 7) vollständig denaturiert und in der Folge durch 16 h Inkubation (4°C, ohne Schütteln) in Renaturierungspuffer (Tab. 7) renaturiert. Nach 10 min Äquilibration in Kinasepuffer (Tab. 7) wurde anschließend die In-Gel-Kinasereaktion durch 30 min Inkubation des Gels in Kinasepuffer mit 1 µCi/ml [γ - 32 P]ATP durchgeführt. Durch 5mal Waschen (30 min) mit Stoppuffer (Tab. 7) wurde die Reaktion abgestoppt und nicht inkorporierte Radioaktivität entfernt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und mit autoradiographisch analysiert.

Tab. 7: Puffer für In-Gel-MBP-Kinasenachweis

Puffer 1:	50 mM 20%	Tris/HCl, pH 8 Isopropanol
Puffer 2:	50 mM 5 mM	Tris/HCl, pH 8 Mercaptoethanol
Denaturierungspuffer:	50 mM 5 mM 6 M	Tris/HCl, pH 8 Mercaptoethanol Guanidin/HCl
Renaturierungspuffer:	50 mM 5 mM 0,04%	Tris/HCl, pH 8 Mercaptoethanol Tween 40
Kinasepuffer:	40 mM 15 mM 2 mM 0,1 mM	HEPES, pH 7,5 MgCl ₂ DTT EGTA
Stoppuffer:	5% 1%	Trichloressigsäure Phosphorsäure

2.7 Immunpräzipitations-Kinasenachweis

Proteinextrakt (50 µg Protein) wurde mit 0,5 µl Antiserum versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden 40 µl einer 50%igen ProteinA-Sepharose CL4B-Suspension (Pharmacia) zugegeben und das Gemisch an einem Rotor inkubiert (4°C, 2 h). Die ProteinA-Sepharose CL4B-Suspension wurde aus lyophilisierter ProteinA-Sepharose CL4B hergestellt. Dazu wurde die gefriergetrocknete Matrix mit tridest-Wasser versetzt, 30 min gerührt, daraufhin unter Verwendung eines Glasfilters intensiv mit Wasser und anschließend mit Puffer A (Tab. 8) gewaschen und schließlich in einem Volumen Puffer A aufgenommen. Die an die Sepharose gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe

wurden durch Zentrifugation präzipitiert und nach Entfernen des Überstands 3mal mit Puffer B, einmal mit Puffer C und einmal mit Puffer D (alle Tab. 8) gewaschen. Anschließend wurde die Kinasereaktion durch 30 min Inkubation in Kinasepuffer A (Tab. 8) bei 28°C unter beständigem Schütteln durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 2xProbenpuffer und 3 min Erhitzen abgestoppt. In einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die Reaktionsprodukte (10 µl) elektrophoretisch aufgetrennt und nach Trocknen des Gels autoradiographisch analysiert.

Tab. 8: Puffer für Immunpräzipitations-Kinasenachweise

Puffer A:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	250 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	5 mM	EGTA
	5 mM	NaF
	0,1%	Tween 20
Puffer B:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
Puffer C:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
Puffer: D	20 mM	HEPES, pH 7,5
	15 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
	1 mM	DTT
Kinasepuffer A	20 mM	HEPES, pH 7,5
	15 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	1 mg/ml	MBP
	10 µg/ml	Leupeptin
	10 µg/ml	Aprotenin
	50 µCi/ml	[γ- ³² P]ATP

2.8 Immunlokalisierung

Petersiliezellen wurden mit 4% Formaldehyd fixiert, in Polyethylenglycol eingebettet und in 2 µm dicke Präparate geschnitten (van Lammeren *et al.*, 1985). Diese wurden nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen (5% BSA in TBS) mit verdünntem primärem Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem sekundärem Antikörper, Streptavidin-gekoppelter Peroxidase und Fluoresceintyramid-Reagenz ("Tyramid Signal amplification System", "TSA Green", Du Pont, Boston, USA). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

2.9 Hefe-Zwei-Hybrid-System

2.9.1 Hefestämme und Plasmide

Für die Arbeiten mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden der Hefestamm PJ69-4A (Tab. 9) und die aufgelisteten Plasmidvektoren (Tab. 10) verwendet.

Tab. 9: Eigenschaften des Hefestamms PJ69-4A

Hefestamm	Genotyp	Ref.
PJ69-4A	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52his3-200, gal4Δ, gal80Δ, Gal2-Ade2, Lys2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ	James <i>et al.</i> (1996)

Tab. 10: Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendete Plasmidvektoren

Plasmid ¹	Marker ²	Insert	Vektor.
pAD-Gal4	.LEU2, Amp ^r	-	-
pBD-Gal4cam	TRP1, Cam ^r	-	-
pBD-HA.M1	TRP1, Cam ^r	MPK1 aus Petersilie + HA-Epitop	pBD-Gal4cam
p53	TRP1, Amp ^r	p53 aus Maus	pBD-Gal4
pLamin C	TRP1, Amp ^r	humanes LaminC (aa 67-230)	pBD-Gal4
pSV40	LEU2, Amp ^r	SV40 großes T-Antigen	pAD-Gal4

¹ Weitere Angaben zu den Plasmiden finden sich für pAD-GAL4 und pBD-GAL4cam im Handbuch zum "HybriZap™ Two Hybrid Kit" (Stratagene), für p53 in Iwabuchi *et al.* (1993), für pLaminC in Bartel *et al.* (1993b) und für pSV40 in Chien *et al.* (1991).

² Selektion in *E. coli* erfolgte über das Ampicillin-Resistenzgen (Amp^r) oder das Chloramphenicol-Resistenzgen (Cam^r).

2.9.2 Medien und Wachstumsbedingungen für Hefen

Hefen wurden nach Standardvorschriften auf Platten oder in Flüssigkultur bei 30°C angezogen (Guthrie und Fink, 1991). Um Hefen unter selektierenden Bedingungen anzuziehen, wurden synthetische SD-Minimalmedien (Tab. 11) verwendet, ansonsten wurden die Hefen in YPAD-Medium (Tab. 11) vermehrt. Selektive SD-Medien für die Erhaltung von Plasmiden oder den Nachweis von Interaktionen der Hybridproteine wurden durch Weglassen der entsprechenden Aminosäuren (Tryptophan, Leucin oder Histidin) bzw Adenin aus der "Dropout"-Mischung hergestellt und nach Sterilisation bei 4°C gelagert. Zum Nachweis der β-Galactosidaseaktivität wurde X-Gal-Medium verwendet. Um Platten herzustellen, wurde vor dem Autoklavieren 2% Agar zugesetzt.

Tab. 11: Hefemedien

YPAD-Medium (pH 5,7)	2%	Pepton
	1%	Hefeextrakt
	2%	Glucose
	40 mg/l	Adeninsulphat
SD-Medium (pH 5,7):	2%	Glucose
	0,5%	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,17%	“Yeast Nitrogen Base“
	0,15%	entsprechende “dropout“-Mischung
X-Gal-Medium (pH 7):	2%	Glucose
	0,5%	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,17%	“Yeast Nitrogen Base“
	0,15%	“dropout“-Mischung (-Trp-Leu)
	0,1M	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
	40 mg/l	X-Gal
“dropout“-Mischung:	40 mg/l	Adeninsulphat
	20 mg/l	L-Arginin-HCl
	100 mg/l	L-Asparginsäure
	100 mg/l	L-Glutaminsäure
	20 mg/l	L-Histidin-HCl ^a
	30 mg/l	L-Isoleucin
	60 mg/l	L-Leucin ^b
	30 mg/l	L-Lysin-HCl
	20 mg/l	L-Methionin
	50 mg/l	L-Phenylalanin
	375 mg/l	L-Serin
	200 mg/l	L-Threonin
	40 mg/l	L-Tryptophan ^c
	30 mg/l	L-Tyrosin
	20 mg/l	Uracil
	150 mg/l	L-Valin

^a Adeninsulphat oder L-Histidin-HCl wurde weggelassen, um auf Interaktion der Hybridproteine zu selektieren.

^b L-Leucin wurde weggelassen, um auf pAD-Vektoren und den Kontrollvektor pSV40 zu selektieren

^c L-Tryptophan wurde weggelassen, um auf pBD-Vektoren und die Kontrollvektoren p53 und pLaminc zu selektieren

2.9.3 Herstellung des Plasmids pBD-HA.M1

Das HA-Epitop wurde als Sall/PstI Fragment in den Vektor pBD-GAL4cam mit Hilfe der phosphorylierten Oligonukleotide 2Ho1 (Sequenz: TCGACTATCCTTATGATG-TTCCGGATTATGCTCTGCA) und 2Ho2 (Sequenz: GAGCATAATCCGGAACATC-ATAAGGATAG) eingeführt. Das entstandene Plasmid wurde als pBD-HA bezeichnet. Der offene Leserahmen von MPK1 wurde durch PCR amplifiziert (Anhang 1), in pGEM-T subkloniert, sequenziert und anschließend als Sall-Fragment in pBD-HA kloniert.

2.9.4 Hefetransformation

Hefen wurden nach der Methode von Gietz und Woods (1993) transformiert. Dazu wurde eine Hefe-Übernachtskultur 40fach in YPAD-Medium verdünnt (5×10^6 Zellen/ml) und 4-6 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellen (50 ml) wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 5000 rpm), mit 25 ml Wasser gewaschen, zentrifugiert, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Hefezellen in 0,4 ml Lithiumacetat aufgenommen und die resultierende Suspension auf 10 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) verteilt. Nach Zentrifugation (30 s, 15000 rpm) und Entfernen des Überstands, wurden folgende Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zugegeben: 240 µl 50% (w/v) PEG (MW 3350, Sigma), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml) (Sigma), 50 µl Wasser + 0,3 µg Plasmid. Die Reaktionsgefäße wurden geschüttelt, bis die Zellen vollständig suspendiert waren, und in der Folge 30 min bei 30°C und anschließend 30 min bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (30 s, 15000 rpm), in 1 ml Wasser resuspendiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert (2-200 µl). Mit dieser Methode konnten Hefen auch mit 2 Plasmiden gleichzeitig transformiert werden.

2.9.5 Screening mit MPK1

Für das Screening wurden Hefen, die bereits das pBD-HA.M1-Plasmid enthielten, nach einem leicht abgeänderten Protokoll transformiert. Die Zellen aus 50 ml Kultur, die wie oben behandelt worden waren, wurden in einem 15 ml Röhrchen (Falcon) mit der 10fachen Menge der oben angegebenen Lösungen und 5 µg Plasmid transformiert. Der Hitzeschock wurde auf 40 min ausgedehnt und die transformierten Zellen am Ende in 10 ml Wasser aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf eine Platte (Durchmesser 13,5 cm) mit SD-His-Medium (-His; -Leu; -Trp) ausplattiert und 3-7 Tage bei 30°C inkubiert.

Kolonien, die in dieser Zeit wuchsen, wurden auf SD-His-, SD-Ade- (-Ade; -Leu; -Trp) und X-Gal-Medium ausplattiert. Aus Kolonien, die auf den beiden Selektionsmedien wuchsen und blaue Farbe auf den X-Gal-Platten zeigten, wurde Plasmid-DNA isoliert, die zur Vermehrung in *E. coli*-DH5α transformiert wurde. Diese Plasmide wurden in PJ69-4A-Hefen retransformiert, die bereits das pBD-HA.M1-, das pLamin C- (Bartel *et al.*, 1993b) oder das p53-Plasmid (Iwabuchi *et al.*, 1993) enthielten. Die Transformanden wurden mit Hilfe des SD-His-, SD-Ade- und X-Gal-Mediums auf Reporterexpression untersucht. Lediglich diejenigen cDNA-Klone wurden als positiv betrachtet, die in dieser Selektionsrunde in Kombination mit pBD-HA.M1 Reporterexpression induzierten, nicht aber in Kombination mit p53 oder pLamin C.

2.9.6 Plasmidpräparation aus Hefe

SD-Flüssigmedium (3 ml) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 2 Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (30 s; 15000 rpm), in 0,2 ml Hefe-Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS) resuspendiert und mit 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) und 0,3 g Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser; Sigma) versetzt. Daraufhin wurde die Suspension 2 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 15000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen, mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol vermischt und zentrifugiert (10 min, 15000 rpm). Der entstandene Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation in 50 µl TE-Puffer (2.2.5) aufgenommen und für die Transformation kompetenter *E. coli*-DH5α verwendet.

2.9.7 Proteinextraktion aus Hefe

Hefezellen wurden in SD-Flüssigmedium (50 ml) bis zu einer OD von 1,5 angezogen, abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 50 µl Puffer P (100 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, 3% SDS) und 0,3 g Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser; Sigma) wurde 2 min geschüttelt. Anschließend wurden 0,4 ml Puffer P zugegeben und die Suspension wurde 3 min auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und für SDS-PAGE und Westernblots verwendet.

2.10 Analyse der Reportergenexpression im Protoplastensystem

2.10.1 Proteinextraktion

Der Protoplastenniederschlag (2.2.5) wurde mit 200 µl LUC-Extraktionspuffer (100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,5, 1 mM DTT) versetzt und 30 s geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und für die Bestimmung der Reporterenzymaktivität benutzt.

2.10.2 Bestimmung der LUC-Aktivität

Zur Bestimmung der LUC-Aktivität (Luciferase) wurden bei Raumtemperatur 10 µl des Protoplastenextrakts mit 100 µl LUC-Substratpuffer (20 mM Tricine pH 7,8, 2,5 mM $MgSO_4$, 1 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, 0,1 mM EDTA, 30 mM DDT, 300 µM Coenzym-A, 500 µM ATP, 500 µM Luciferin) (Hartmann *et al.*, 1998) versetzt und die resultierende Lumineszenz mit einem "Luminoscan Ascent" (Labsystems, Helsinki, Finnland) über jeweils 5 s bestimmt.

2.10.3 Bestimmung der GUS-Aktivität

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität (β -Glucuronidase) wurden 50 μ l des Protoplastenextrakts mit 50 μ l GUS-Substratpuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7, 10 mM Mercaptoethanol, 2 mM 4-MUG, 0,1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h und nach 3 h wurden 20 μ l des Reaktionsgemischs zu 150 μ l 0,4 M $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ gegeben und die Fluoreszenz bestimmt (360 nm Excitation /440 nm Emission) (Cytofluor II, Biosearch, Bedford, USA).

2.10.4 Errechnung der normierten GUS-Aktivität

Zur Bestimmung der normierten GUS-Aktivität wurde die Differenz des 1 h- und des 3 h-Fluoreszenzmesswerts gebildet und dieser Wert durch die Luciferaseaktivität (relative Einheiten) geteilt. Aus den parallelen Proben wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.