



universität
wien

MASTERARBEIT

Mechanismen der Mikroben-Pflanzen-Interaktion im Zellkernproteom von *Arabidopsis thaliana*

verfasst von

Roman Bauer, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 833

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ökologie

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Immunantwort bei Pflanzen	1
1.2	Zellkern Proteom.....	3
1.3	Phosphoproteomics	4
1.4	Masenspektrometrie in Proteomics	5
1.5	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Pflanzenmaterial	7
2.1.1	für die Phosphopeptidanreicherung	7
2.1.2	für die Mikroben-Pflanzen-Interaktion	7
2.2	Zellkernisolierung.....	8
2.3	Mikroskopie DAPI.....	10
2.4	Protein Extraktion	10
2.5	SDS-PAGE	10
2.6	Protein Verdau und Entsalzen.....	11
2.7	Phosphopeptid Anreicherung	11
2.8	Nano ESI LC-MS-MS.....	11
2.9	Datengewinnung.....	12
2.9.1	Proteinidentifizierung mittels Datenbank abhängiger Analyse von MS-Daten	12
2.9.2	Datenbank unabhängige quantitative Analyse von MS Daten (MSQuant).....	12
2.9.3	Datenbanken zur Proteinlokalisierung	13
2.9.4	Statistische Auswertung.....	13
3	Ergebnisse	13
3.1	Kernisolation und Probenaufbereitung	13
3.2	DAPI.....	14
3.3	SDS – PAGE.....	16
3.4	Zuordnung der Proteine mit SUBA.....	18
3.5	Identifizierung von Phosphopeptiden und Phosphoproteinen	21
3.6	Unterschiede im Zellkernproteom nach der Behandlung mit flg22/elf18	24
3.6.1	Unterschiede bei flg22	27
3.6.2	Unterschiede bei elf18	28

4	Diskussion.....	29
4.1	Kernisolation	29
4.2	DAPI.....	29
4.3	SDS-PAGE	29
4.4	Zuordnung der Proteine mit SUBA.....	30
4.5	Identifizierung von Phosphopeptiden und Phosphoproteinen	30
4.6	Unterschiede im Zellkernproteom nach der Behandlung mit flg22/elf18	31
4.6.1	Unterschiede bei flg22 und elf18	31
4.6.2	Unterschiede bei flg22	31
4.6.3	Unterschiede bei elf18	31
4.6.4	Spuren von LRR-RLKs, NB-LRR Proteinen und WRKY Transkriptionsfaktoren	32
5	Summary	33
6	Zusammenfassung	34
7	Literatur	35
8	Danksagung	40
9	Anhang.....	41
9.1	Liste der identifizierten Proteine nach der Phosphopeptidanreicherung	41
9.2	Liste der identifizierten Proteine für die Mikroben-Pflanzen-Interaktion.....	45
9.3	Curriculum vitae.....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Evolution der Resistenzfähigkeit.....	3
Abbildung 2: Versuchsreihe beim Besprühen	8
Abbildung 3: Zellkerne in der Interphase	9
Abbildung 4: Probe mit angereicherten Zellkernen, Vergrößerung: 40x.....	15
Abbildung 5: Probe mit angereicherten Zellkernen im UV-Licht, Vergrößerung 40x	15
Abbildung 6: 2 Zellkerne, Vergrößerung 100x	15
Abbildung 7: 2 Zellkerne im UV-Licht, Vergrößerung 100x.....	16
Abbildung 8: SDS-Gel mit Gesamtproteinextrakten und angereicherten Zellkernproteinen.....	17
Abbildung 9: SDS-Gel mit angereicherten Zellkernproteinen	18
Abbildung 10: Proteinverteilung in einer Gesamtproteinextraktion nach SUBA.....	20
Abbildung 11: Proteinverteilung der angereicherten Zellkernproteine nach SUBA.....	20
Abbildung 12: MS-Spektrum und MS/MS-Spektrum	22
Abbildung 13: Übersicht der Zellkernproteine.....	25

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Datenübersicht zu den Gesamtproteinextrakten und angereicherten Zellkernproteinen	19
Tabelle 2: Identifizierten Spektren und Proteinen (Phosphopeptidanreicherung)	23
Tabelle 3: Identifizierte Zellkernproteine.....	23
Tabelle 4: Signifikante Änderungen gegenüber der unbehandelten Vergleichsprobe.....	26

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AmBic	Ammoniumbicarbonat
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
EFR	EF-Tu Rezeptor
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETI	Effector-Triggered Immunity
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
FA	Formaldehyd
FDR	False Discovery Rate
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
LC	Flüssigkeitschromatographie
LRR	Leucine – Rich Repeat
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAP	Mitogen Aktiviertes Protein
MAPK	MAP - Kinase
MAPKK	MAPK - Kinase
MAPKKK	MAPKK - Kinase
MS	Massenspektrometrie
NB	Nucleotide Binding
NOD	Nucleotide – Binding Oligomerization Domain Containing Protein
PAC	Phosphoramidate Chemistry
PAMP	Pathogen Assoziierte Molekulare Muster
PRR	Pattern Recognition Receptors
PTI	PAMP Triggered Immunity
PTM	Posttranslationale Modifikation
RLK	Rezeptor Ähnliche Kinasen
RLP	Rezeptor Ähnliche Proteine
SC	Spectral Count
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll – Ähnlicher Rezeptor
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography

1 Einleitung

1.1 Die Immunantwort bei Pflanzen

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen ein sehr effektives Immunsystem entwickelt, welches ihnen die Abwehr von mikrobiologischen Keimen ermöglicht. Im Gegensatz zu höheren Tieren besitzen sie keine differenzierten Zellen eines Immunsystems sondern jede Zelle ist selbstständig in der Lage die Immunantwort auszulösen. Die primäre Immunantwort basiert auf dem Erkennen von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) und wird als PAMP triggered immunity (PTI) bezeichnet [34]. PAMPs sind konservierte Aminosäuresequenzen in spezifischen bakteriellen Proteinen. Wie Pflanzen reagieren ebenfalls Tiere auf konservierte Aminosäuresequenzen potentieller Pathogene.

Während Tiere die PAMPs mit Toll-ähnlicher Rezeptor (TLR) und nucleotide-binding oligomerization domain containing proteins (NOD) als Pattern Recognition Receptors (PRR) erfassen, besitzen Pflanzen andere PRRs, wie zum Beispiel Rezeptor Ähnliche Kinasen (RLK) und Rezeptor Ähnliche Proteine (RLP).

Kommt eine Pflanze mit Mikroben in Kontakt werden die PAMPs von den PRR erkannt [47, 27]. Viele Bakterien bewegen sich mit Hilfe von Flagellen fort. Da Tiere und Pflanzen oft mit harmlosen und pathogenen Bakterien in Kontakt kommen haben sie die Fähigkeit Teile der Struktur von Flagellen zu erkennen. Flagellin ein Protein aus dem bakteriellen Flagellum enthält einige Aminosäuresequenzen die für Tiere und Pflanzen einen Virulenzfaktor darstellen. Eine 22 Aminosäuren lange Sequenz in einer hoch konservierten Domäne am N-terminalen Teil (flg22) dieses Proteins wird von FLS2 registriert [16]. Selbst geringe Mengen synthetisierter Peptide dieser Domäne, bestehend aus 15-22 Aminosäuren, lösen in nanomolaren Konzentrationen eine Immunantwort bei einigen Pflanzen aus [10]. Bei der Translation von Proteinen an den Ribosomen spielen Elongationsfaktoren eine wichtige Rolle. Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) ist in Bakterien das abundanteste Protein und wird von *Arabidopsis thaliana* und anderen Brassicaceen als PAMP erkannt. Die molekulare Struktur von EF-Tu ist stark konserviert. Das 18 Aminosäuren lange acetylierte Peptid (elf18) am N-terminalen Ende des Proteins löst in Arabidopsis-Pflanzen eine Immunantwort aus [27]. Elf18 wird von einem LRR-RLK registriert, dem EF-Tu – Rezeptor (EFR), welcher FLS2 vom Aufbau sehr ähnelt [48].

Die PRR aktivieren Mitogen Aktivierte Protein Kinase (MAP) – Kaskaden (MAPKKK, MAPKK und MAPK) via phosphorylierung welche dann WRKY Transkriptionsfaktoren aktivieren [1, 21]. Es

können mehrere Kaskaden gleichzeitig aktiviert werden und davon sind wiederum einige Kinasen redundant [4]. Die MAPKKK wird im Signalweg als erstes aktiviert und ist selbst eine Serin- und Threoninkinase. Diese aktiviert die MAPKK, welche eine Serin-, Threonin- und Tyrosinkinase ist. Die MAPK wird von der MAPKK aktiviert. Die MAPK phosphoryliert und aktiviert ihre jeweiligen Zielproteine wie zum Beispiel WRKY Transkriptionsfaktoren, welche an die DNA binden oder die Genexpression steuern. Es können unterschiedliche Kaskaden gleichzeitig Signale weiterleiten, wobei sich diese Signale teilweise gegenseitig beeinflussen können. Diese aktivieren Transkriptionsfaktoren, welche weitere Signalkaskaden auslösen, Genabschnitte aktivieren, unterdrücken oder im Verbund mit anderen Transkriptionsfaktoren multimere DNA-Bindungskomplexe bilden können. Die durch die Signalkaskaden aktivierten Genabschnitte und Ribosomen bilden Proteine gegen Stress und lösen die PAMP triggered immunity (PTI) aus [8]. Die Pflanze leitet somit Maßnahmen ein welche das Bakterienwachstum an ihrer Oberfläche hemmen kann [23].

Pathogene wären nicht so erfolgreich hätten sie dagegen keine Gegenmaßnahmen entwickelt. Über das Typ III Sekretionssystem leiten sie Effektor Proteine in die Pflanzenzellen ein, die die Signalweiterleitung in der MAP – Kaskade und der anschließenden Immunantwort blockieren. Die Verteidigung der Pflanze wird somit deaktiviert und daraus resultiert eine effector-triggered susceptibility (ETS) [8, 20].

Nucleotide binding – (NB) leucine-rich repeat (LRR) Proteine der Pflanze erkennen diese Effektor Proteine und stellen mittels effector-triggered immunity (ETI) die Resistenz wieder her. Abbildung 1 stellt diese Immunantwort grafisch dar:

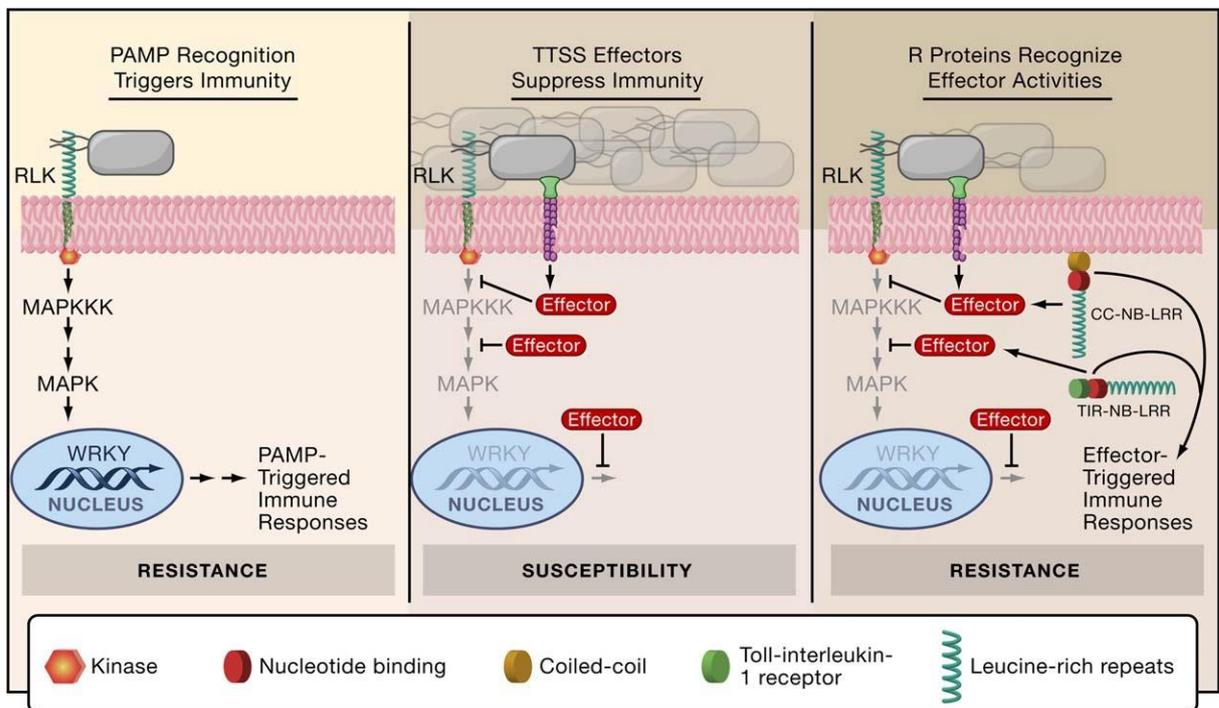


Abb. 1: Modell für die Evolution der Resistenzfähigkeit von Pflanzen gegenüber Bakterien [8]

1.2 Zellkern Proteom

Zu dem Zellkern Proteom werden alle Proteine gezählt, die im Nucleus vorkommen. Dazu zählen auch jene, die nur temporär anwesend sind [12]. Der Zellkern ist ein von einer Membran umgebenes Organell, welches den größten Teil des genetischen Materials bei Eukaryoten enthält. Er spielt bei der Genexpression und Genregulierung eine wichtige Rolle und fungiert somit als Kontrollzentrum der Zelle. Der Zellkern besteht neben dem Nucleoplasma aus folgenden Strukturen: Die Kernmembran (=Doppelmembran) trägt auf der äußeren Membran Ribosomen und geht dort in das raue endoplasmatische Retikulum über. Durch die äußere und innere Membran gehen große Proteinkomplexe, die Kernporen, welche den Transport von bestimmten Molekülen in und aus dem Zellkern ermöglichen. An die innere Membran grenzt die Lamina, die den Zellkern mechanisch stützt. Sie besteht aus Laminen und Lamin bindenden Membranproteinen, welche im Cytoplasma gebildet werden [15]. Der Nucleolus synthetisiert rRNA und koordiniert den Aufbau von ribosomalen Untereinheiten [3, 43]. Er liegt an spezifischen sich wiederholendene rDNA Abschnitten, die als nucleolar organizer regions (NOR) bezeichnet werden. Die DNA bildet bei Eukaryoten mit Proteinen (Histonen) einen Komplex zu Chromatin und wird in weiterer Folge zu einem Chromosom komprimiert. In der Interphase liegen große Bereiche der DNA aktiv als Euchromatin und kleinere Bereiche inaktiv als Heterochromatin vor. Die

Euchromatinabschnitte werden häufig transkribiert und können jederzeit repliziert werden. Hingegen sind die Bereiche des Heterochromatins selten oder kaum der RNA und DNA Polymerase zugänglich. Modifikationen an Histonen können die Genexpression aktivieren oder unterdrücken [22]. Diese Veränderungen haben neben DNA Methylierungen ebenfalls Auswirkungen auf den epigenetischen Code [44].

Im Zellkern befinden sich neben Strukturproteinen und Enzymen zahlreiche Signalproteine, welche Informationen weiterleiten und unter anderem Transkriptionsfaktoren aktivieren [34]. Proteine können funktionell folgendermaßen klassifiziert werden: Impliziert in Signaltransduktion und Genregulierung, Proteinfaltung (Chaperone), Degradation (Proteasen), RNA Metabolismus, Strukturproteine, Translation, DNA-Replikation-Reparatur-Modifikation und Proteine die im Kohlenstoffmetabolismus eingreifen [5].

1.3 Phosphoproteomics

Als Teilbereich von Proteomics versucht man mittels Phosphoproteomics all jene Proteine zu erfassen, die als posttranslationale Modifikation mindestens eine Phosphatgruppe aufweisen.

Wird eine Aminosäure in einem Protein phosphoryliert, kann die zweifach negativ geladene Phosphatgruppe eine positiv geladene Seitenkette anziehen. Das verändert die Struktur und beeinträchtigt die Bindung von Liganden an der Proteinoberfläche [18]. Die Aktivität des Proteins ist somit verändert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Phosphatgruppe ein anderes Protein anzieht und sich ein Proteinkomplex bildet [41]. Wird das Protein dephosphoryliert wird der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt. Reversible Phosphorylierung von Proteinen reguliert deren Aktivität, Struktur, zelluläre Lokalisation und spielt eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung in Zellen.

Je nach Protein und Phosphorylierungsstelle kann die Stöchiometrie der Phosphorylierung von 90% bis weniger als 10% liegen [39]. Proteinphosphorylierungen die in Signalwegen eine regulatorische Funktion aufweisen treten meist mit einer geringen Stöchiometrie und das auch nur vorübergehend auf [24]. Diese Signalproteine kommen in so kleinen Mengen vor, dass eine Anreicherung vor der Analyse durchgeführt werden sollte. Die Isolierung von Phosphoproteinen bzw. Phosphopeptiden erfolgt üblicherweise mittels chemischen oder affinitätsbasierenden Methoden.

Bei einer der chemischen Methoden entfernt man die Phosphatgruppen von Phosphoserin und Phosphothreonin durch beta-Eliminierung. Die daraus entstandenen Doppelbindungen können

mit anderen Nucleophilen reagieren. Das Phosphopeptid kann so markiert und anschließend isoliert werden [26].

Eine weitere chemische Methode isoliert neben phosphorylierten Serin- und Threoninpeptiden auch Peptide die Phosphotyrosin enthalten. Durch den Einsatz von Phosphoramidate Chemie (PAC) werden Phosphopeptide an die feste Phase gebunden während alle nicht phosphorylierten Peptide raus gewaschen werden. Erst im sauren Milieu lösen sich die Phosphopeptide von der Phase. [46] Hierbei verliert das Peptid seine Phosphatgruppe nicht.

Zu den affinitätsbasierenden Methoden für die Phosphopeptidisolierung zählt die immobilized metal affinity chromatography (IMAC) bei der Ga^{3+} [38], Fe^{3+} [29] oder Zn^{2+} Ionen zum Einsatz kommen. Mit Titandioxid (TiO_2), Zirkoniumoxid (ZrO_2) [6] und Aluminiumhydroxid $Al(OH)_3$ [45] lassen sich Phosphopeptide ebenso anreichern. Dabei bilden sich unspezifische Bindungen zwischen den negativ geladenen Peptiden und den Metallionen. Die Metallkationen fungieren als Lewis-Säure und bilden mit allen Atomen die freie Elektronenpaare besitzen einen Akzeptor-Donator-Komplex. Abhängig vom pH-Wert des Milieus und den Modifikationen der Peptide sind diese Komplexe unterschiedlich stabil. Mit einem Waschschrift entfernt man Peptide die weniger gut am Metalloxid haften. Durch Zugabe von Lauge löst man die verbleibenden Peptide aus dem Komplex. Die Methoden sind unterschiedlich effizient und isolieren die verschiedenen Phosphopeptide unterschiedlich gut [39].

1.4 Massenspektrometrie in Proteomics

Die Identifizierung von Proteinen aus komplexen biologischen Proben stellt aufgrund starker Konzentrationsunterschiede und deren unterschiedlichen Eigenschaften eine besondere Herausforderung dar. Viele Methoden stoßen dabei auf ihre Grenzen. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) ermöglicht es aus solchen Proben tausende Proteine in relativ kurzer Zeit auf einmal zu identifizieren und zu quantifizieren. Jedoch können bei der Analyse mittels Massenspektrometrie die Signale der weniger dominanten Proteine von jenen der häufig vorkommenden überlagert werden. Ein weiteres Problem ist, dass viele Proteine teilweise aus den gleichen Peptiden bestehen, welches wiederum die quantitative Interpretation von massenspektrometrischen Ergebnissen erschweren kann [2].

Um diese Störfaktoren zu minimieren werden die extrahierten Proteine oder Peptide so weit wie möglich voneinander getrennt. Häufig erfolgt das mittels SDS Gelelektrophorese oder HPLC. Damit

die Proteine im Massenspektrometer analysiert werden können müssen sie ionisiert und in die Gasphase gebracht werden. Mit Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) und Electrospray ionization (ESI) können große Moleküle wie Proteine ionisiert werden ohne dabei zu fragmentieren. Bei der MALDI müssen die Proteine zuerst in eine Matrix eingebaut werden. Der Laser regt die Matrixmoleküle an, die darauf mit den Proteinen abgesprengt werden. Bei diesem Prozess werden die Matrixmoleküle und Proteine ionisiert und dem Massenspektrometer zugänglich gemacht.

Bei der ESI laufen die Proteine in Lösung durch eine Metallkapillare. An der unter Spannung stehenden Spitze der Kapillare sammeln sich die geladenen Lösungs- und Proteinionen. Dabei entstehen kleine Tröpfchen, die von der Gegenelektrode angezogen werden. Während dessen verdampft das Lösungsmittel und die einfach bis mehrfach geladenen Proteine gelangen so in das Massenspektrometer. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass man direkt eine HPLC vorschalten kann und so komplexere Proben einfacher zu analysieren sind. Bei Proteomics LC-MS werden die Proteine in den meisten Fällen mit Trypsin zu Peptiden verdaut und diese über eine HPLC aufgetrennt und anschließend in das MS injiziert. Das Gerät misst zu einem Zeitpunkt ein Spektrum aller Peptide und daraus üblicher Weise CID Fragment Spektren (MS/MS-Scan) der Peptide mit der höchsten Intensität aus dem Gesamtscan. Jedem MS/MS Spektrum kann mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit eine Peptidsequenz zugeordnet werden.

Mit der Massenspektrometrie lassen sich Proteine auch quantitativ bestimmen. Dadurch kann man die Funktion der Proteine in den komplexen biologischen Netzwerken besser verstehen. Es gibt Methoden bei denen die Proteine mit stabilen Isotopen markiert werden (metabolic labeling, chemical labeling) [36] und markierungsfreie Methoden wie zum Beispiel spectral count (SC). Die Methoden unterscheiden sich unter anderem in ihrer Genauigkeit, der Erfassung aller Proteine und der Erfassung der Proteinanzahl. Der Vorteil im SC liegt darin, dass er schnell und leicht durchzuführen ist. Man kann damit die Häufigkeit der Proteine zwischen und innerhalb der Proben vergleichen. Dabei wird jedes MS/MS Spektrum gezählt, welches das charakteristische Peptid eines Proteins identifiziert [35]. Ein Nachteil dabei ist, dass häufiger auftretende (abundante) Proteine leichter gefunden werden und seltenere eventuell nicht gefunden werden. Die abundanten Proteine können vom Massenspektrometer mit "Dynamic Exclusion" ausselektiert werden damit seltenere besser identifiziert werden können [40].

1.5 Zielsetzung

In allen Lebewesen spielt die Signalweiterleitung innerhalb von Zellen eine wichtige Rolle. Informationen gelangen so zu den unterschiedlichen Organellen und die Zelle kann dadurch auf äußere Einflüsse reagieren. Der unmittelbare Ort der Regulation der Genexpression ist der Zellkern. Aus diesem Grund war das Ziel meiner Arbeit Zellkerne aus *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zu isolieren und das Zellkern-Proteom mittels LC-MS zu analysieren. Da viele Signalproteine phosphoryliert sind versuchte ich des Weiteren aus isolierten Zellkernen Phosphopeptide anzureichern und mittels LC-MS zu analysieren.

Schließlich wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit flg22 und mit elf18 besprüht. Diese hochkonservierten bakteriellen Proteinstrukturen lösen in den Pflanzen eine Signalkaskade aus, welche eine Immunantwort hervorruft. Die Zellkern-Proteome dieser behandelten und von weiteren nicht behandelten Pflanzen wurden analysiert und miteinander verglichen um differentielle Mechanismen der PTI auf verschiedenen PAMPs im Zellkern zu entschlüsseln.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 für die Phosphopeptidanreicherung

Für die Anreicherung der Phosphopeptide aus den isolierten Zellkernen wurden die vorhandenen *Arabidopsis thaliana* WT Pflanzen aus dem Glashaus verwendet. Die Pflanzen innerhalb einer Versuchsreihe waren gleich alt. Das Alter der Pflanzen zwischen den Versuchsreihen bewegte sich von sechs bis sieben Wochen. Da die Pflanzen im Hochsommer wuchsen und mehr Sonnenlicht zur Verfügung hatten, bildeten diese nur wenige kleine Blätter aus und standen beim Ernten in Blüte. Für die Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet.

2.1.2 für die Mikroben-Pflanzen-Interaktion

Hier liegt der Fokus auf den Unterschieden zwischen den Versuchsreihen. Deshalb wurde darauf geachtet, dass die Wachstums- und Erntebedingungen der Proben nahezu identisch sind. Alle Pflanzen waren etwa acht Wochen alt. Da zu dieser Jahreszeit weniger natürliches Licht vorhanden war, hatten alle Pflanzen eine gut ausgebildete Blattrosette und standen nicht in Blüte. Es gab drei

Versuchsreihen, wobei eine davon eine Stunde vor der Ernte mit 1 μM flg22 – Lösung und eine weitere mit 1 μM elf18 – Lösung besprüht wurden. Die dritte Versuchsreihe blieb unbehandelt. Die Pflanzen der Versuchsreihen wurden an unterschiedlichen Tagen aber jeweils um 13 Uhr geerntet um tageszeitabhängige physiologische Unterschiede zu minimieren.



Abb. 2: Arabidopsis thaliana Pflanzen der Mikroben-Pflanzen-Interaktion: Versuchsreihe beim Besprühen

2.2 Zellkernisolierung

Die Isolierung der Zellkerne erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Folta und Kaufmann [13]. Reagenzien spezifisch für die Zellkernisolation wurden dem Cellytic PN Isolation/-Extraction Kit for plant leaves / CELLYTPN1-1KT (Sigma-Aldrich) entnommen. Alle Reagenzien wurden auf Eis gekühlt sowie bei allen Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass das Probenmaterial auf Eis bzw. 4 °C gekühlt blieb.

Ungefähr 10 g junge Arabidopsis-Blätter wurden mit einer Schere geerntet und in ein 250 ml Becherglas gegeben. Nach der Zugabe von 30 ml Nuclei Isolation Buffer wurden die Blätter mittels einer rotierenden Rasierklinge ca. 10 min homogenisiert. Bei den Proben für die Phosphopeptidanreicherung wurde um die Phosphatasen zu unterdrücken NaF bis zu einer Konzentration von 10 mmol und Phosphatase Inhibitor cocktail bis auf eine Konzentration von 0,1% hinzugefügt. Das daraus entstandene leicht zähflüssige Homogenat wurde in einem Trichter durch 8 Schichten in Nuclei Isolation Buffer getränktes miracloth Filterpapier gefiltert und in einem 50

ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Während die Lösung mittels Magnetrührer vorsichtig gerührt wurde, wurde tropfenweise 2,7 ml 10 %iges Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,9 % zugegeben. Die Lösung wurde für 10 bis 15 min am Magnetrührer inkubiert. In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde ein 35 %/80 % Percoll Dichtegradient etabliert. Unter 6 ml 35 % Percoll wurde vorsichtig 80 % Percoll pipettiert. Das gefilterte Homogenat wurde auf die Oberfläche des Dichtegradienten aufgetragen. Nach dem Zentrifugieren (2000 g, 35 min, 4 °C Bremse auf Stufe 4) konnte man in der Interphase eine hellgraue Schicht aus Zellkernen erkennen (siehe Abbildung 3). Der cytosolische Überstand wurde abpipettiert. Die Zellkerne wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen, in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Nuclei Isolation Buffer auf 10 ml Volumen ergänzt. Während die Lösung mittels Magnetrührer vorsichtig gerührt wurde, wurde tropfenweise 0,9 ml 10 %iges Triton X-100 (Endkonzentration 0.8%) zugegeben. Die Suspension von Zellkernen wurde mit 6 ml 35 % Percoll unterschichtet und anschließend zentrifugiert (2000 g, 15 min, 4 °C, Bremse auf Stufe 4). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Nuclei Isolation Buffer gelöst und in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und anschließend zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Der Rückstand wurde mit 100 µl Nuclei Pure Storage Buffer und 2 µl Proteinase inhibitor cocktail versetzt und mit einem Pinsel darin resuspendiert. Bei den Proben für die Phosphopeptid Anreicherung wurden zusätzlich 2 µl Phosphatase inhibitor cocktail zugefügt. Die isolierten Zellkerne wurden bei -20 °C zwischengelagert.

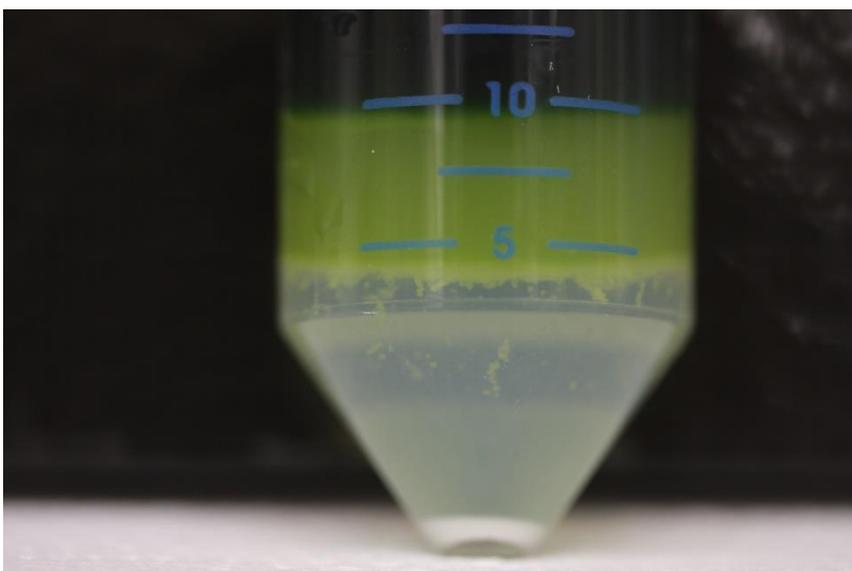


Abb. 3: Zellkerne in der Interphase (zwischen grüner und farbloser Phase)

2.3 Mikroskopie DAPI

5 µl DAPI Vorratslösung 5 mg /ml wurden mit Nuclei Pure Storage Buffer auf 100 µl aufgefüllt. 30 µl dieser Lösung wurden mit 10 µl der Zellkernproben 10 min lang vermischt. Davon wurden einige µl auf einem Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Im Anschluss wurde im Mikroskop unter UV-Licht die Qualität der Zellkerne kontrolliert.

2.4 Protein Extraktion

Der Rückstand mit den isolierten Zellkernen wurde abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Nach dem Verwerfen des Überstands wurde der Rückstand mit 100µl Extraction Buffer Mischung versetzt, bei Raumtemperatur 30 min am Vortex stark gemischt und im Anschluss wieder abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand, angereichert mit gelösten Zellkernproteinen, wurde in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches bei -80 °C zwischengelagert wurde. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Proteinbestimmung ermittelt [7].

2.5 SDS-PAGE

Eine Möglichkeit um Proteine zu trennen und die Qualität der Proteinextraktion zu überprüfen ist die SDS-PAGE. Dabei wurden die Zellkernproteine mit Gesamtproteinextrakt von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen verglichen.

Die Elektrophorese wurde mit einem Protean TM II System von Biorad durchgeführt. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die gesäuberten Glasplatten gefüllt und mit Ethanol 40% überschichtet. Nach dem Aushärten (ca. 1h) wurde das Sammelgel darüber geschichtet und der Kamm zur Auftrennung der Probenräume hinein geschoben. Das Gel wurde über Nacht bei +4 °C im Kühlschrank zwischengelagert. Etwa 10 µg Probenmaterial wurden mit dem SDS Probenpuffer unter schütteln inkubiert (3 min, 95°C). Roti - Mark Standard wurde als Molekulargewichtsmarker herangezogen.

Zu beginnt wurde bei der Elektrophorese eine Spannung von 120 V angelegt. Nachdem die Lauffront in das Gel übergegangen ist wurde die Spannung auf 280 V erhöht. Als die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte wurde der Lauf beendet.

Das Trenngel wurde vom Laufgel abgetrennt und in die Coomassie Färbelösung gelegt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwölf Stunden wurde das Gel alle zwei Stunden mit einer frischen Lösung von Ethanol 40 %ig entfärbt bis die Banden gut sichtbar waren.

2.6 Protein Verdau und Entsalzen

Die Proteinextrakte wurden mit dem gleichen Volumen Puffer für den Enzymverdau (10 % ACN, 50 mM AmBic, 2 mM CaCl₂) versetzt und mit Lys-C (1:100 v/v, Roche, Mannheim, Germany) für fünf Stunden bei 37 °C verdaut. Der zweite Verdauungsschritt erfolgte mit Porozyme Immobilized Trypsin Beads (1:10 v/v, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) ca. 15 h bei 37 °C.

Die Proben wurden mit C18-SPEC 96-well plates (Varian, Darmstadt, Deutschland) laut der Anleitung des Herstellers entsalzt. Anschließend wurden die in Methanol gelösten Proben in der SpeedVac getrocknet.

2.7 Phosphopeptid Anreicherung

Eine Mobicol "F" Säule (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) wurde mit 4 mg TiO₂ gefüllt. Diese wurde zum Auffangen der Waschlösungen in ein 3 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt. Nach jeder Zugabe von Reagenzien bzw. der Probe, wurde die Flüssigkeit in der Säule in das Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (700g, 2 min, 4°C). Um mögliche Verunreinigungen auszuwaschen wurden zuerst 100µl 0,3 % NH₄OH/30 % ACN zugegeben. Danach wurde einmal mit 100 µl TFA (Trifluoressigsäure) gewaschen. Die Säule wurde mit 100 µl einer Lösung von 50% ACN, 2,5% TFA und gesättigter Phthalsäure equilibriert. Die getrocknete Probe wurde im selben Reagenz gelöst und in die Säule überführt. Die Säule wurde mit der gelösten Probe für 15 min kopfüber rotiert. Die Probe wurde zweimal mit 100 µl gesättigter Phthalsäurelösung, zweimal mit 50 % ACN, 0, 1% TFA und zweimal mit 0,1 % TFA gewaschen. Die Peptide wurden mit zweimal einer 0,3 M NH₄OH/30 % ACN Lösung herausgelöst und in ein low-bind Reaktionsgefäß pipettiert. Der Deckel der Röhrchen wurde dreimal eingestochen und die Proben in der SpeedVac einrotiert.

2.8 Nano ESI LC-MS-MS

Die getrockneten Proben wurden in MilliQ Wasser mit 5 % ACN und 0,1 % FA gelöst. 5µg Protein wurden auf eine Chromolith HPLC Säule (10 cm Länge, 100 µm Innendurchmesser, Merck, Darmstadt, Germany) mittels Autosampler (HTC PAL, CTC Analytics) geladen. Die Auftrennung

erfolgte über eine UHPLC (Eksigent) mit einem Gradienten von 90 % Lösung A (MilliQ, 0,1 % FA) zu 80 % Lösung B (80 % ACN, 0,1 % FA). Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit einer daran angeschlossenen LTQ Orbitrap XL (Thermo Science Fisher) durchgeführt.

Ein Lauf der Phosphopeptide dauerte 125 min. Innerhalb eines Aufnahmezyklus fanden 6 Scan Events statt mit 5 MS2 Scans. Der Scan Bereich ging von 300 bis 1800 m/z. Die Dynamic exclusion war mit einer Ausschlusszeit von 15 sec aktiviert. Das Screening auf den Ladungszustand war auf Abweisung von +1 Ladungen programmiert.

Die mit den Elicitoren behandelten Proben wurden in 155 min aufgetrennt. Es fanden in einem Aufnahmezyklus 2 Scan Events statt mit 7 MS2 Scans und der Scan Bereich lag von 300 bis 2000 m/z. Die Dynamic exclusion war mit einer Ausschlusszeit von 60 sec aktiviert. Das Screening auf den Ladungszustand war aktiviert auf Abweisung von nicht zuordenbaren und +1 Ladungen.

2.9 Datengewinnung

2.9.1 Proteinidentifizierung mittels Datenbank abhängiger Analyse von MS-Daten

Der Sequest Suchalgorithmus [9] implementiert in dem Proteome Discoverer (v 1.3, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen herangezogen. Die Massenspektren wurden dabei in silico generierten Massen und Fragmentmassen tryptischer Peptide aller Arabidopsis-Proteine aus den Datenbanken TAIR9 und TAIR10 gegenübergestellt.

Um falsch positive Ergebnisse herauszufiltern wurde eine Zufallsdatenbank generiert. Spektren die dieser Datenbank zugeordnet werden sind werden zwangsläufig falsch annotiert und erlauben so mit die Berechnung der False Discovery Rate (FDR). Es wurden nur Peptide mit einer Xcorr >2 und einem Signifikanzniveau $\alpha=0.05$ (FDR q-value<0,05) berücksichtigt. Zu jedem identifizierten Protein musste mindestens ein dafür spezifisches Peptid vorhanden sein.

2.9.2 Datenbank unabhängige quantitative Analyse von MS-Daten (MSQuant)

MSQuant ist eine Open Source Software, welche mittels Algorithmen aus den gemessenen Massen einer RAW - Datei die vorhandenen Proteine quantifiziert [32]. Weitere Algorithmen errechnen den MS3 Score, die eine genauere Identifizierung von PTMs auf spezifischen Peptidresten ermöglicht. Zusätzlich unterstützt das Programm Proteinquantifizierungsmethoden wie Markierung mittels stabilen Isotopen und markierungsfreie Ionenintensitätsmethoden.

2.9.3 Datenbanken zur Proteinlokalisierung

SUBA: Die SUBzelluläre Lokalisationsdatenbank für Arabidopsis (SUBA) sammelt Informationen über die Lokalisation von Proteinen in der Zelle aus vielen anderen Datenbanken speziell für Arabidopsis [19].

TAIR: Die Arabidopsis Informationsresource (TAIR) ist die zentrale Infrastruktur zur Arabidopsisforschung, welche stets mit neuen Daten aus Genetik und Molekularbiologie erweitert wird [37]. Neben der Proteinlokalisierung bietet diese Datenbank viele nützliche weitere Tools.

2.9.4 Statistische Auswertung

Für den Versuch für die Pflanzen-Mikroben-Interaktion wurden die Daten von den unbehandelten Pflanzen jeweils mit denen mit flg22 und elf18 besprühten Pflanzen verglichen. Für fehlende quantitative Werte wurde der Wert 0,3 eingefügt. Es wurden paarweise t-Tests mit einem Signifikanzniveau $\alpha=0.05$ durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Kernisolation und Probenaufbereitung

Um die Zellwände aufzubrechen, wurden die Blätter von jungen Arabidopsis-Pflanzen mit einer rotierenden Rasierklinge in einer Pufferlösung zerkleinert. Die Pflanzen wurden nicht schockgefroren und verrieben, da das resultierende kalte Pulver im folgenden Schritt mit der Pufferlösung Eiskristalle bilden würde. Dadurch würde das Isolieren der Zellkerne behindert werden.

Anschließend wurden die Zellkerne durch Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Bestandteilen abgetrennt. Durch nochmalige Zugabe von Triton X-100 wurden Bestandteile von Zellorganellen gelöst und dadurch besser isoliert. Um mögliche vorhandene Verunreinigungen zu minimieren, wurde die Lösung mit den Zellkernen nochmals zentrifugiert und die obere graue Schicht (Zellkerne) mit einem Pinsel aufgerührt und mit einer Pipette in ein frisches Röhrchen überführt.

Die Anwesenheit von Zellkernen bzw. Zellkernmaterial wurde mit DAPI-Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

Um Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen einer Gesamtproteinextraktion und angereicherten Zellkernen von Arabidopsis-Blättern zu prüfen, wurden die jeweiligen Proben einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Aufwendigere Methoden wie z.B. Western Blot würden zu diesem Zweck gleich viele Informationen liefern.

Damit keine zu langen Peptidketten und somit große Massen in das Massenspektrometer gelangen, wurde neben Trypsin zusätzlich mit Lys-C Protease verdaut.

Um den Verlust von Phosphorylierungen gering zu halten, wurden bei sämtlichen Aufbereitungsschritten in kleinen Mengen NaF und Phosphataseinhibitor zugefügt.

Die Phosphopeptide wurden mit TiO_2 angereichert, da diese Methode einfach durchzuführen und sehr Effizient ist.

3.2 DAPI

Da in dieser Arbeit der Fokus auf dem Zellkernproteom liegt, wurde zunächst die Qualität der isolierten Zellkerne mittels DAPI überprüft.

Eine Probe mit angereicherten Zellkernen wurde mit DAPI eingefärbt und unter dem Mikroskop Nikon MICROPHOT SA betrachtet. In Abbildung 4 sieht man einen großen Ausschnitt der aufgetragenen Probe. Abbildung 5 zeigt diesen im UV-Licht. Aufgrund der mit DAPI markierten DNA, welche im UV-Licht leuchtet, kann man gut erkennen, dass es sich bei den meisten Partikeln um Zellkerne oder Zellkernteile handelt.

In Abbildung 6 und 7 befinden sich stark vergrößert zwei Zellkerne. Die Bilder zeigen, dass viele Zellkerne vorliegen und davon auch einige unbeschadet und ganz sind.

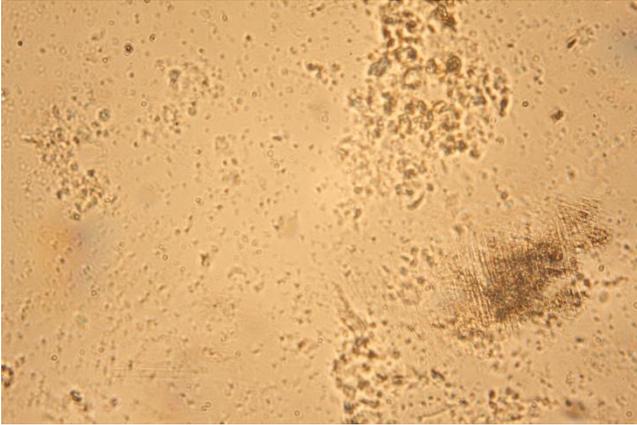


Abb. 4: Probe mit angereicherten Zellkernen, Vergrößerung: 40x

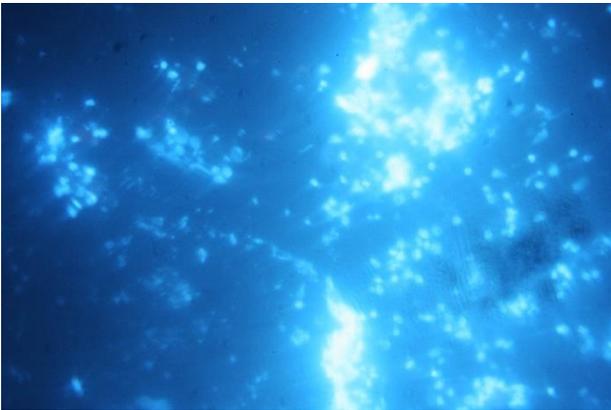


Abb. 5: Probe mit angereicherten Zellkernen im UV-Licht, Vergrößerung 40x

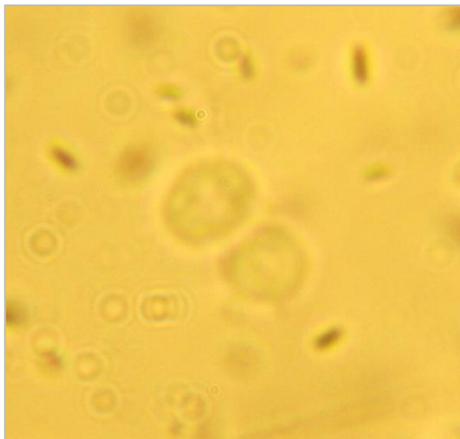


Abb. 6: 2 Zellkerne, Vergrößerung 100x

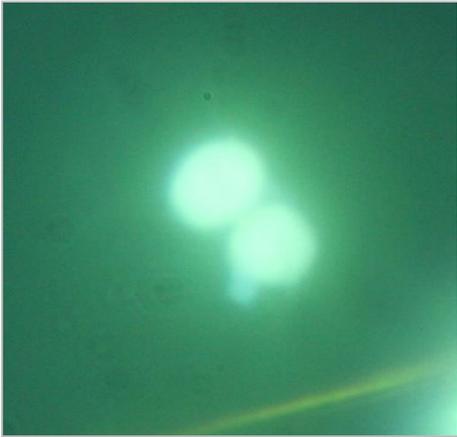


Abb. 7: 2 Zellkerne im UV-Licht, Vergrößerung 100x

3.3 SDS-PAGE

Es wurden zwei SDS-Gele angelegt. Auf einem SDS-Gel wurde eine Probe der angereicherten Zellkernproteine neben vier Gesamtproteinextraktionen aufgetragen. Am anderen fünf Zellkernproteinextrakte. Die Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt.

Am ersten Gel (Abb. 8) wurde nach Unterschieden zwischen Gesamtproteinextrakten und angereicherten Zellkernproteinen gesucht. Auf der Spur mit den angereicherten Zellkernproteinen ist im Gegensatz zu den Gesamtproteinextrakten die Farbintensität einiger Banden stark reduziert. Einige Banden scheinen ganz zu fehlen, andere Banden sind wiederum stärker ausgebildet. Durch Vergleichen der Banden erhält man einen guten optischen Eindruck über die unterschiedliche Proteinzusammensetzung.

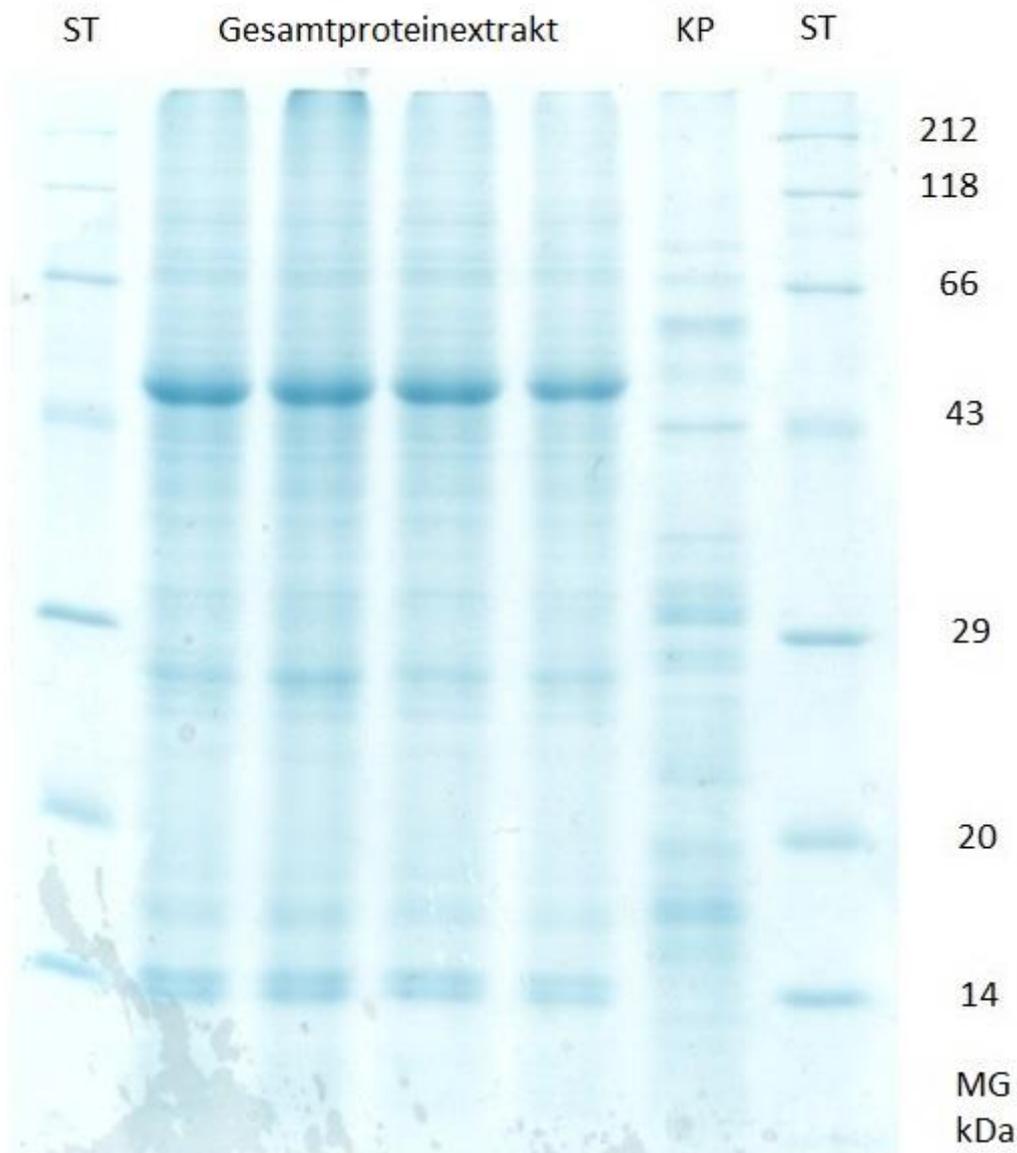


Abb. 8: SDS-Gel mit Gesamtproteinextrakten und angereicherten Zellkernproteinen. Auf der ersten und letzten Spur ist der Molekulargewichtsmarker (Roti – Mark Standard) aufgetragen. Vier Proteinmuster von Arabidopsis-Blättern wurden zum Vergleich neben einem Muster von Zellkernproteinen aufgetragen.

Am zweiten Gel (Abb. 9) wurde überprüft, ob sich die Muster der unterschiedlichen Zellkernproteinproben unterscheiden. Die Spuren der Proben sind identisch. Nur die Proteinbanden mit niedrigem Molekulargewicht lassen sich bei den schwächer konzentrierteren Proben schwerer erkennen.

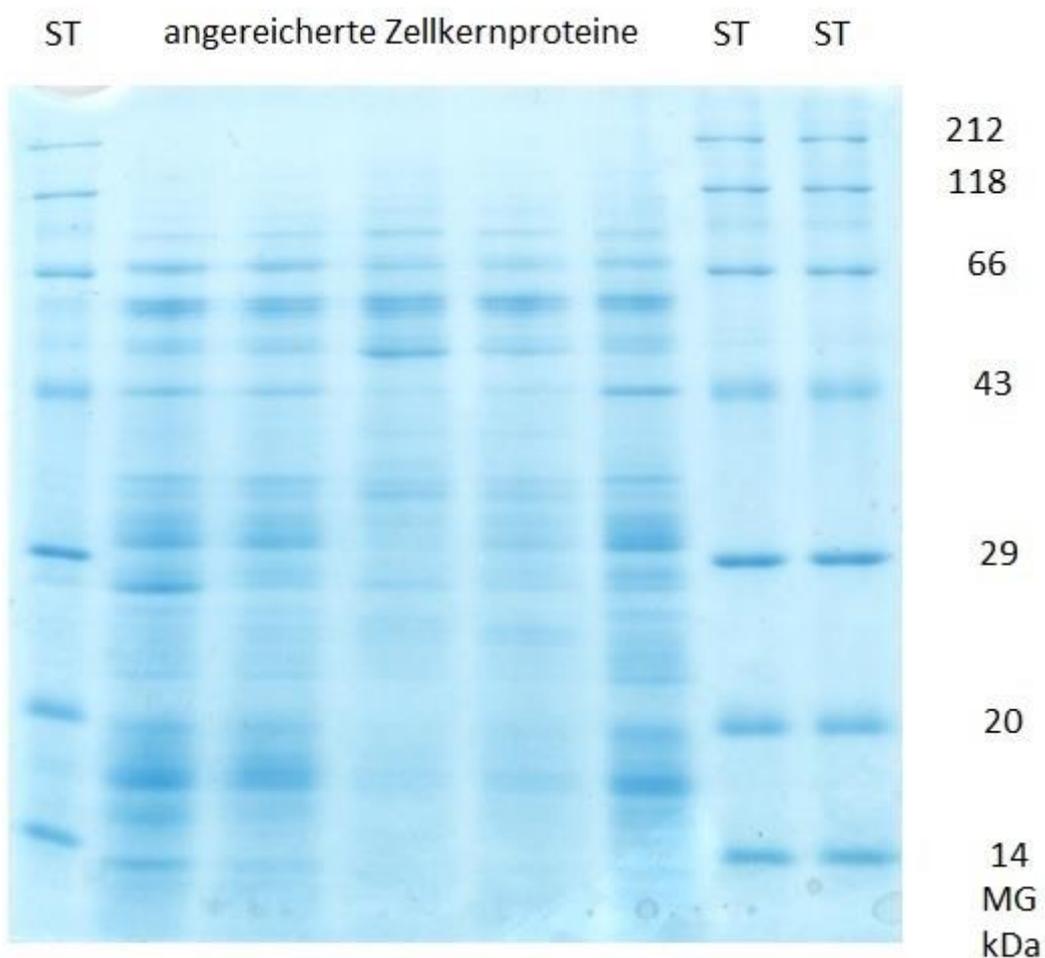


Abb. 9: SDS-Gel mit angereicherten Zellkernproteinen. Auf der ersten und den letzten zwei Spuren befindet sich der Molekulargewichtsmarker. Auf den Spuren zwei, drei und sechs wurden 10 μg Zellkernprotein aufgetragen, auf den Spuren vier und fünf nur 5 μg Zellkernprotein.

3.4 Zuordnung der Proteine mit SUBA

Jeweils drei Proben von Gesamtproteinextrakten und angereicherten Zellkernproteinen wurden mittels LC-MS analysiert. Die Lokalisierung der identifizierten Proteine erfolgte mit SUBA. Die Anzahl der sich im Zellkern auffindbaren Proteine der unterschiedlichen Extrakte wurde ermittelt. Die Gegenüberstellung dieser Ergebnisse liefert Zahlen, welche aussagekräftiger als Gelbanden der SDS-Page sind.

Der Datensatz mit angereicherten Zellkernproteinen bestehend aus 7530 MS-Spektren und 833 identifizierten Proteinen wurde mit einem Datensatz von einem Gesamtproteinextrakt bestehend aus 18512 MS-Spektren und 1739 identifizierten Proteinen verglichen (siehe Tabelle 1).

Tab. 1: Datenübersicht zu den Gesamtproteinextrakten und angereicherten Zellkernproteinen

	Proteine	Peptide	PSMs
Gesamtproteinextrakt	1739	3230	18512
Zellkernproteinextrakt	833	899	7530

Bei der Proteinlokalisierung mit SUBA konnten im Zellkernproteinextrakt doppelt so viele experimentell nachgewiesene Zellkernproteine und ca. 50 % mehr vorhergesagte Zellkernproteine identifiziert werden (siehe Abb. 10 und Abb. 11).

SUBA ist eine Datenbank für Arabidopsis und erhält ihre experimentellen Daten zu einem Teil aus TAIR 10. Informationen zu Sets aus mitochondrialen und chloroplastischen Open Reading Frames (ORF) stammen aus GenBank Y08501 und AP000423. Daten von Massenspektrometriestudien und Green-fluorescent-Protein-Method (GFP) wurden aus PubMed entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Zusätzliche Informationen kamen aus TAIR, Swiss-Prot und AmiGO.

Zur Vorhersage der Proteinlokalisierung verwendet SUBA folgende Programme: AdaBoost, ATP, BaCello, ChloroP 1.1, EpiLoc, iPSORT, MitoPred, MitoProt, MultiLoc2, Nucleo, PCLR 0.9, Plant-mPloc, PProwler 1.2, Predotar v1.03, PredSL, PTS1, SLPFA, SLP-Local, SubLoc, Targetp 1.1, WoLF PSORT und YLoc. Die Proteinsequenzen wurden aus TAIR10 abgerufen [42].

Proteinverteilung in einer Gesamtproteinextraktion

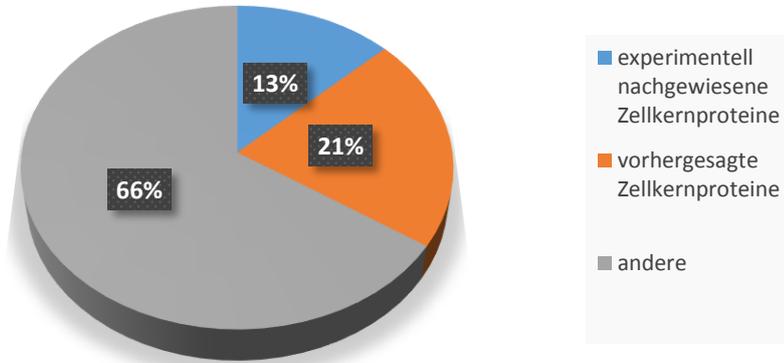


Abb. 10: Proteinverteilung in einer Gesamtproteinextraktion nach SUBA

Proteinverteilung nach der Zellkernisolierung

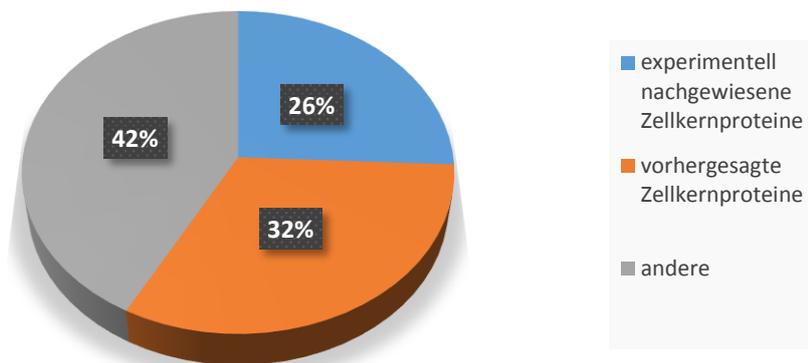


Abb. 11: Proteinverteilung der angereicherten Zellkernproteine nach SUBA

3.5 Identifizierung von Phosphopeptiden und Phosphoproteinen

Aus ursprünglich drei Proben mit isolierten Zellkernen wurden Phosphopeptide angereichert. Die Anreicherung von Phosphopeptiden hat einige Vorteile gegenüber der Phosphoproteinanreicherung. Bei der Phosphoproteinanreicherung gehen bei Ausfällungen viele der extrem sauren, alkalischen, kleinen oder hydrophoben Proteine verloren. Die weniger abundanten Proteine verschwinden daher. Bei einer Phosphopeptidanreicherung gibt es dieses Problem nicht. Zusätzlich sind Peptide für nachfolgende Chromatographieschritte besser geeignet als Proteine [11].

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen betrifft viele Zellfunktionen: Regulierung des Zellzyklus, der Transkription und Translation sowie Zelldifferenzierung, Apoptose, Signalweiterleitung und Proteintransport.

Um die Phosphopeptide mittels IMAC-Methode anzureichern, müssen zuerst Zellwandbestandteile, Sekundärmetaboliten und Nukleinsäuren entfernt werden. Nachdem die gereinigten Proteine enzymatisch zu Peptiden verdaut sind, erfolgt die Phosphopeptidanreicherung [11].

Aus deren Analyse mittels LC-MS resultierte nur einen kleinen Datensatz bestehend aus 363 MS/MS Spektren, bei dem die Phosphopetidanreicherung gut funktionierte. Aus diesem Datensatz wurden mit der Software Mascot Proteine und Peptide identifiziert. Der PTM-Score wurde mit MSQuant berechnet.

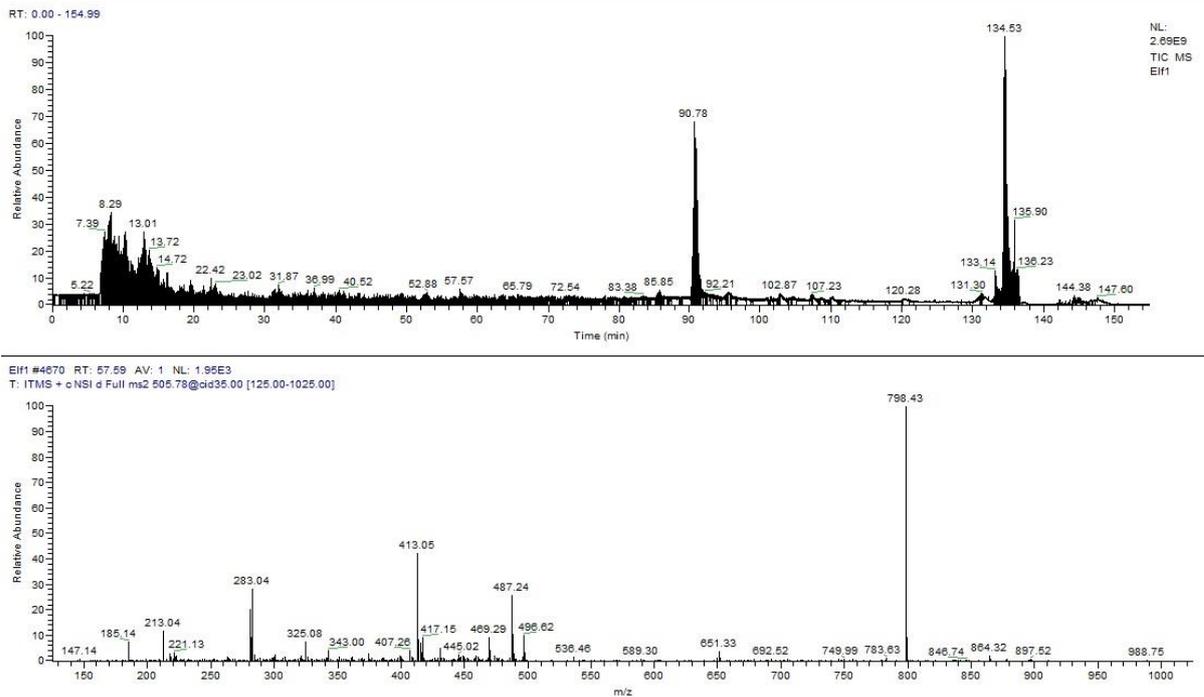


Abb. 12: MS-Spektrum und MS/MS-Spektrum

Bei der oberen Grafik von Abb. 12 handelt es sich um ein Ionenchromatogramm. Dabei wird die relative Häufigkeit der Ionen (y-Achse) entlang der Zeit (x-Achse) gemessen. Zu jedem Signal des Ionenchromatograms wird ein MS/MS-Spektrum gemessen. Das darunter befindliche MS/MS Spektrum zeigt die relative Häufigkeit der fragmentierten Ionen (y-Achse) und deren Verhältnis Masse zur Ladung (x-Achse). Anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses bzw. der daraus resultierenden Masse der Ionenfragmente kann man die Masse der ursprünglichen Peptide errechnen. Durch die Identifikation von Peptiden, die charakteristisch für bestimmte Proteine sind, lassen sich Proteine identifizieren.

Bei der Anreicherung von Phosphopeptiden und auch anderen PTMs kann die mögliche zusätzliche Masse dieser Modifikationen in den Bruchstücken berechnet werden. In manchen Fällen, abhängig von den gemessenen Fragmenten, kann sich die Zuordnung der PTM zur richtigen Aminosäure jedoch schwierig gestalten.

In Tabelle 2 erkennt man, dass mehr als 25% der identifizierten Spektren und Proteine Phosphatgruppen aufweisen. Von 29 identifizierten Phosphoproteinen können 16 dem Zellkern zugeordnet werden.

Ein Score von 23 bei Mascot entspricht einem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$.

Tabelle 3 zeigt eine Auflistung der identifizierten Zellkernproteine mit deren Funktion.

Tab. 2: Überblick zu den identifizierten Spektren und Proteinen des Zellkernproteoms nach der Phosphopeptidanreicherung

	Alle	phosphorylierte
Identifizierte MS/MS (Score ≥ 30)	363	97
Identifizierte Proteine (Score ≥ 40)	101	29
Identifizierte Zellkernproteine		16

Tab. 3: Identifizierte Zellkernproteine

Name	ganzer Name	Funktion
AT1G48410.1	AGO1 (ARGONAUTE 1)	development.unspecified
AT5G55300.1	TOP1BETA (DNA TOPOISOMERASE 1 BETA)	DNA.synthesis/chromatin structure
AT1G17210.1	zinc ion binding	not assigned.no ontology
AT1G68790.1	LINC3 (LITTLE NUCLEI3)	not assigned.no ontology
AT4G32285.1	epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein	not assigned.no ontology
AT4G11860.1	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G22960.1)	not assigned.unknown
AT4G31880.1	binding	not assigned.unknown
AT2G38770.1	EMB2765 (EMBRYO DEFECTIVE 2765)	not assigned.unknown
AT1G70770.1	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G23170.1)	not assigned.unknown
AT4G28080.1	binding	not assigned.unknown
AT5G25780.1	EIF3B-2 (eukaryotic translation initiation factor 3B-2)	protein.synthesis.initiation

AT2G41840.1	40S ribosomal protein S2 (RPS2C)	protein.synthesis.ribosomal protein
AT1G01100.1	60S acidic ribosomal protein P1 (RPP1A)	protein.synthesis.ribosomal protein
AT2G27710.1	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2B)	protein.synthesis.ribosomal protein
AT3G55460.1	SCL30 (SC35-like splicing factor 30); RNA binding	RNA.processing.splicing
AT1G72150.1	PATL1 (PATELLIN 1); transporter	transport.misc

3.6 Unterschiede im Zellkernproteom nach der Behandlung mit flg22/elf18

Es wurden von drei unterschiedlichen Proben jeweils drei technische Replikate mittels LC-MS gemessen. Bei allen handelt es sich um *Arabidopsis thaliana*-Blätter, deren Zellkerne angereichert und daraus Proteine extrahiert wurden. Davon wurde eine Pflanzenreihe mit flg22 und einer weitere mit elf18 behandelt. Eine Vergleichsreihe war unbehandelt. Das Peptid flg22, das ein Bestandteil des bakteriellen Flagellin ist, löst in der ganzen Arabidopsis-Pflanze einen Oxidativen Burst aus, regt die Callose- und Ethylenproduktion an und aktiviert Genabschnitte, die bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen [16]. Das aus 18 Aminosäuren bestehende Peptid im Elongationsfaktor Tu, elf18, initiiert in den Blättern von Arabidopsis-Pflanzen einen Oxidativen Burst, die Ethylenproduktion wird in Gang gesetzt und es entsteht eine Resistenz gegenüber nachfolgende Infektionen mit Bakterien [27].

In diesen neun Messungen wurden 7530 Spektren gemessen und 497 Proteine identifiziert. Mittels Spectral Count konnten bei insgesamt 33 Zellkernproteinen große Unterschiede in der Häufigkeit der gemessenen MS-Spektren (mehr als doppelt so viel oder weniger als die Hälfte) von den behandelten gegenüber den unbehandelten Pflanzen festgestellt werden.

Abb. 13 beschreibt, dass bei der Probe mit flg22 bei acht Zellkernproteinen signifikant mehr und bei fünf eine signifikant weniger MS-Spektren als bei der unbehandelten Probe gemessen wurden. Die Proben mit elf18 weisen bei drei Proteinen wesentlich mehr Spektren und bei zehn Proteinen wesentlich weniger Spektren vor.

Von sieben Zellkernproteinen gab es, sowohl in der flg22- als auch in der elf18- gegenüber der unbehandelten Probe, eindeutige Unterschiede in der MS-Spektrenanzahl. Bei der flg22-Probe war diese bei einem Protein erhöht und bei sechs Proteinen niedriger als bei der Vergleichsprobe. Bei elf18 waren von diesen sieben Proteinen die MS-Spektrenanzahl niedriger als die der Vergleichsprobe.

flg22	elf18		
	7		
8↑	1↑	0↑	3↑
5↓	6↓	7↓	10↓

Abb. 13: Übersicht der Zellkernproteine deren Spektrenanzahl mindestens doppelt so hoch oder unter der Hälfte der unbehandelten Probe lag.

Die Pfeile geben an ob weniger oder mehr Spektren gemessen wurden. Die 7 in der Mitte weist darauf hin, dass die Spektrenanzahl bei denselben sieben Proteinen jeweils bei flg22 und elf18 signifikant erhöht oder niedriger als bei der Vergleichsprobe waren.

In Tabelle 4 sind diese Proteine mit Nummer, Name, Coverage, Summe der identifizierten Spektren und deren Funktion aufgelistet. Zusätzlich wurden die errechneten p-Werte eingetragen, ebenso die Faktoren, um die sich die Spektrenanzahl von den mit flg22 und elf18 versetzten Proben von jener der unbehandelten unterscheidet. Bei den leeren Feldern wurden die Auswertekriterien nicht erfüllt.

Tab. 4: Signifikante Änderungen gegenüber der unbehandelten Vergleichsprobe

Accession	Description	coverage	Σ MS/MS	flg22		elf18		Funktion
				x von na	p-Wert	x von na	p-Wert	
AT5G14520.1	pescadillo-related	1,86	4			3,33	0,036	development.unspecified
AT1G77180.1	chromatin protein family	10,6	42			0,05	0,001	DNA.synthesis/chromatin structure
AT4G40030.1	Histone superfamily protein	19,85	20	20,00	0,023			DNA.synthesis/chromatin structure.histone.core.H3
AT1G09200.1	histone H3	19,85	17	16,67	0,007			DNA.synthesis/chromatin structure.histone.core.H3
AT1G07660.1	Histone superfamily protein	56,31	116			0,50	0,001	DNA.synthesis/chromatin structure.histone.core.H4
AT1G29250.1	Alba DNA/RNA-binding protein	18,46	10	13,33	0,010			not assigned.unknown
AT3G18790.1	unknown protein	12,67	24			0,08	0,012	not assigned.unknown
AT2G35635.1	ubiquitin 7	26,62	54			0,20	0,000	protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin
AT3G23990.1	heat shock protein 60	4,85	20	0,08	0,010			protein.folding
AT4G25340.1	FK506 BINDING PROTEIN 53	3,35	10	0,08	0,010	0,08	0,010	protein.folding
AT1G12310.1	Calcium-binding EF-hand family protein	13,51	8	6,67	0,024			protein.postranslational modification
AT4G20360.1	ATRABE1B (ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG E1B)	11,76	19			0,08	0,004	protein.synthesis.elongation
AT4G30690.1	Translation initiation factor 3 protein	17,44	29	6,00	0,001			protein.synthesis.initiation
AT2G24060.1	Translation initiation factor 3 protein	11,54	38	4,00	0,008			protein.synthesis.initiation
AT1G33120.1	Ribosomal protein L6 family	31,44	36	0,08	0,012			protein.synthesis.ribosomal protein
AT5G30510.1	RPS1 (RIBOSOMAL PROTEIN S1)	15,38	29	4,00	0,011	0,15	0,011	protein.synthesis.ribosomal protein
AT3G07050.1	GTP-binding family protein	4,98	12	0,10	0,020	0,10	0,000	protein.synthesis.ribosome biogenesis
AT3G22660.1	rRNA processing protein-related	5,12	17	0,15	0,024			protein.synthesis.ribosome biogenesis
AT1G48920.1	nucleolin like 1	11,49	33	3,00	0,008			protein.synthesis.ribosome biogenesis
AT4G20130.1	plastid transcriptionally active 14	3,73	14	0,08	0,048	0,08	0,048	PS.calvin cycle.rubisco interacting
ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha	8,88	27	0,33	0,038	0,05	0,007	PS.lightreaction.ATP synthase.alpha subunit
ATCG00480.1	ATP synthase subunit beta	7,83	12	0,08	0,033	0,08	0,003	PS.lightreaction.ATP synthase.beta subunit
AT1G03130.1	photosystem I subunit D-2	21,57	14			0,15	0,024	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits
AT3G11630.1	Thioredoxin superfamily protein	12,41	18			0,08	0,048	redox.peroxiredoxin.BAS1
AT3G49430.2	SER/ARG-rich protein 34A	17,51	40			0,08	0,003	RNA.processing.splicing
AT1G80070.1	Pre-mRNA-processing-splicing factor	1,91	14	0,10	0,000	0,33	0,007	RNA.processing.splicing
AT4G39260.1	cold, circadian rhythm, and RNA binding 1	27,81	42			3,00	0,007	RNA.regulation of transcription.GRP
AT1G56110.1	homolog of nucleolar protein NOP56	13,03	44			0,04	0,016	RNA.regulation of transcription.putative transcription r.
AT2G21660.1	cold, circadian rhythm, and rna binding 2	43,75	90	2,33	0,025			RNA.RNA binding
AT1G51510.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	11,88	7			0,30	0,036	RNA.RNA binding
AT2G15430.1	DNA-directed RNA polymerase family protein	16,93	10	0,15	0,024			RNA.transcription
AT4G35800.1	RNA polymerase II large subunit	1,58	12	0,50	0,006			RNA.transcription
AT3G09440.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	6,16	14			6,67	0,024	stress.abiotic.heat

3.6.1 Unterschiede bei flg22

Die flg22-Probe unterschied sich bei 20 Proteinen signifikant von der unbehandelten Probe. Einige dieser Proteine lassen sich in folgende Gruppen einteilen.

DNA-Synthese

Zwei Histone superfamily Proteine (AT4G40030.1; AT1G09200.1) wurden identifiziert. Diese Proteine befinden sich im Kernbereich des Histons H3, sie sind beteiligt am Chromatinaufbau und binden an die DNA.

Protein-Faltung

HSP60-Proteine wie (AT3G23990.1) sind hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert und bringen neu entstandene Proteine in die richtige Sekundärstruktur.

FK506 Binding Protein 53 (AT4G25340.1) ist an der Faltung von Histonen beteiligt. Es fungiert dabei als Chaperon.

Protein-Synthese

Die Proteine (AT4G30690.1; AT2G24060.1) sind Bestandteile des Translation-Initiationsfaktors 3. Translations-Initiationsfaktoren sind an der Translation der mRNA beteiligt.

Bei den folgenden zwei Proteinen handelt es sich um ribosomale Proteine: Das Ribosomal Protein L6 (AT1G33120.1) der 60S-Untereinheit und das Ribosomal Protein S1 (AT5G30510.1) der 30S Untereinheit.

Nucleostemin-Like 1 (AT3G07050.1) spielt eine wichtige Rolle bei der Blütenentwicklung.

Nucleolin like 1 (AT1G48920.1) ist an der Synthese von Ribosomen, DNA-Verarbeitung und bei der Anordnung von Leitbündel beteiligt.

RNA-Transkription

Das Protein Abnormal Suspensor 2 (AT1G80070.1) befindet sich im katalytischen Zentrum des Proteinkomplexes von U4-, U5- und U6-Spliceosomen. Als eines der größten und stark konservierten Kernproteine wirkt es bei wichtigen Umstrukturierungen auf molekularer Ebene mit [17].

Glycine-rich RNA-binding Protein 7 (AT2G21660.1) ist in eine Vielzahl von Zellfunktionen involviert. Bei Kälte, Salz und osmotischem Stress kontrolliert es das Öffnen der Stomata. Zusätzlich ist es beim Immunsystem der Pflanze, bei RNA Chaperon Aktivität, RNA Spleißen und beim Blühen beteiligt [30].

3.6.2 Unterschiede bei elf18

Die elf18-Probe unterscheidet sich bei zwanzig Proteinen signifikant von der unbehandelten Probe. Einige dieser Proteine lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

DNA-Synthese

SNW/SKI-Interacting Protein (AT1G77180.1) gehört zur Chromatin protein family und fungiert als Transkriptionsfaktor. Das Histon superfamily protein (AT1G07660.1) befindet sich im Kernbereich des Histons H4 und ist in dessen Faltung involviert.

Protein-Faltung

Das Protein (AT3G09440.1), eines der Hsp70 – Proteine, bringt neu entstandene Proteine in die richtige Sekundärstruktur.

Protein-Synthese

RAB GTPase homolog E1B (AT4G20360.1) zeigt Aktivitäten als Elongationsfaktor.

RNA-Bindung

Glycine-rich RNA-binding Protein 8 (AT4G39260.1) ist beim RNA-Spleißen und Blühen beteiligt [30].

Folgende Proteine (AT4G25340.1; AT5G30510.1; AT3G07050.1; AT1G80070.1; AT2G21660.1), auf die im flg22-Teil eingegangen wurde, wichen auch hier in der Spektrenanzahl von der unbehandelten Probe ab.

4 Diskussion

Pflanzen sind neben abiotischen Umwelteinflüssen und Fressfeinden ebenso Pathogenen ausgesetzt. Damit infizierte Pflanzen effizienter geheilt werden können, ist ein fundiertes Wissen über deren Immunsystem unabdinglich. Sie müssen Pathogene erkennen und entsprechend darauf reagieren. Somit kann man grob unterteilen in Pathogenerkennung und Immunantwort. In dieser Arbeit beschäftige ich mich mit der Immunantwort von Pflanzen. Da die Immunantwort vom Zellkern ausgeht habe ich den Fokus auf Unterschiede im Zellkernproteom von mit flg22 und elf18 inokulierten Arabidopsis-Pflanzen im Vergleich zu unbehandelten Arabidopsis-Pflanzen gelegt.

4.1 Kernisolation

Um die Konzentration der Zellkernproteine zu erhöhen, wurden die Zellen der Pflanzenblätter zerstört und die Zellkerne mittels Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Die Qualität der Zellkerne wurde mit DAPI-Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Qualität der Kernproteinanreicherung wurde zuerst mit SDS-PAGE beurteilt. Anschließend wurden die Ergebnisse des Massenspektrometers mit SUBA ausgewertet.

4.2 DAPI

Mittels DAPI Färbung konnte unter dem Mikroskop festgestellt werden, dass sich im Rückstand viele intakte Zellkerne befanden (Abb. 5-7). Das bestätigt, dass Aufschluss des Pflanzenmaterials und die Isolierung der Zellkerne jedenfalls teilweise funktioniert.

4.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE lässt uns schnell und übersichtlich zwei unterschiedliche Proteinfractionen miteinander vergleichen. Auf Abb. 8 sieht man eindeutig wie das Zellkernproteinextrakt einige Banden weniger als das Gesamtproteinextrakt aufweist. Das ist ein Zeichen dafür, dass gewisse Proteine signifikant dezimiert wurden. Die in dem Gesamtproteinextrakt stark sichtbare, bei 55 kDa lokalisierte Bande enthält als Hauptkomponente die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO). Dieses Protein kommt im Zellkern nicht vor. Das fehlen in der Kernextraktion ist ein weiteres gutes Indiz für die saubere Trennung der Kerne von der cytoplasmatischen Fraktion.

Viele Banden des Zellkernextraktes sind stärker sichtbar als jene äquivalenten Banden des Gesamtproteinextraktes. Das liegt daran, dass auf den Spuren die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Durch das Fehlen gewisser Proteine im Zellkernproteinextrakt sind daher die anderen Proteine häufiger vorhanden.

4.4 Zuordnung der Proteine mit SUBA

Mit SUBA können wir herausfinden wo sich die identifizierten Proteine in der Zelle befinden. Es wurde die Menge der Zellkernproteine von Gesamtproteinextrakten mit derer von Zellkernproteinextrakten verglichen. Wenn man Abb. 10 mit Abb. 11 vergleicht, erkennt man, dass die Anzahl der experimentell nachgewiesenen Zellkernproteine nach der Zellkernisolierung doppelt so hoch ist wie beim Gesamtproteinextrakt. Die Anzahl der vorhergesagten Zellkernproteine ist nach der Zellkernisolierung um 50% höher als beim Gesamtproteinextrakt. Somit hätten wir nach der Zellkernisolierung die Konzentration von Zellkernproteinen etwa verdoppelt.

4.5 Identifizierung von Phosphopeptiden und Phosphoproteinen

Man kann in den Ergebnissen feststellen, dass die Spektrenanzahl sehr niedrig ist. Durch die vorgegangene Zellkernisolierung konnte nur eine geringe Menge an Proteinen gewonnen werden. Die anschließende verwendete Methode der Phosphopeptidanreicherung benötigt theoretisch eine wesentlich höhere Proteinmenge damit ausreichend Material übrig bleibt. Pro Zellkernisolierung wurde eine Menge von ca. 0,2 mg Protein gewonnen. Für die Phosphopeptidanreicherung wären 1,5 mg Protein notwendig gewesen. Ich versuchte es trotzdem mit der kleinen aus der Zellkernisolierung gewonnenen Menge. Von drei Versuchen erhielt ich bei einem ein zufriedenstellendes Ergebnis.

Von den 101 identifizierten Proteinen waren 29 phosphoryliert. Somit stieg der Anteil der phosphorylierten Proteine aus dem Zellkernproteinextrakt etwa auf ein Drittel der Gesamtproteinmenge. Von diesem können 16 dem Zellkern zugeordnet werden.

4.6 Unterschiede im Zellkernproteom nach der Behandlung mit flg22/elf18

4.6.1 Unterschiede bei flg22 und elf18

Protein Faltung

FK506 Binding Protein 53(AT4G25340.1) unterdrückt die Expression von ribosomalen RNA Genen der 18S rDNA. Da bei den mit flg22 und elf18 behandelten Pflanzen dieses Protein nicht gefunden wurde, fand bei diesen Pflanzen vermutlich eine Über-Expression von ribosomalen RNA Genen der 18S rDNA statt. Das kann die Folge einer eingeleiteten Immunantwort sein [28].

4.6.2 Unterschiede bei flg22

Protein Faltung

HSP60 (AT3G23990.1) wirkt zusätzlich antiapoptotisch [25]. Da in der mit flg22 versetzten Probe keine Spektren zu HSP60 Proteinen entdeckt wurden und in den anderen Proben zumindest eine geringe Anzahl, kann das ein Hinweis dafür sein, dass die Anwesenheit von flg22 die Apoptose einleiten kann.

RNA Transkription

Das Glycine-rich RNA-binding Protein 7 oder GRP7 (AT2G21660.1) ist bei der Immunantwort involviert. Knockout Arabidopsis-Pflanzen, welche dieses Protein nicht bilden können sind wesentlich anfälliger gegenüber *Pseudomonas syringae*. GRP7 ist auch das Ziel des Typ III Effektor Proteins „HopU1“ von *Pseudomonas syringae* [14]. Die Anwesenheit von PAMPs führt zu einer Überexpression von GRP7 bei Pflanzen. Eine erhöhte Konzentration von GRP7 stärkt die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber von Pathogenen [33]. Hier war die Konzentration von GRP7 doppelt so hoch wie in der Vergleichsprobe. Das kann eindeutig als eine PTI gewertet werden.

4.6.3 Unterschiede bei elf18

Protein Faltung

HSP70 Proteine sind an der Signalweiterleitung, Regulierung des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Apoptoses beteiligt. Unter Stressbedingungen erhöht sich die Konzentration von HSP70 Proteinen [31]. Das Protein (AT3G09440.1) konnte hier im Gegensatz zur unbehandelten Probe nachgewiesen werden.

4.6.4 Spuren von LRR-RLKs, NB-LRR Proteinen und WRKY Transkriptionsfaktoren

In jeweils einer Messung konnten einmalig Spektren von den LRR-RLKs (AT3G24240.1; AT1G07550.1) und den NB-LRR Proteinen (AT5G17680.1; AT2G17060.1) nachgewiesen werden. In einer einzigen Messung wurden 2 Spektren von WRKY4 (AT1G13960.2) identifiziert. Die geringe gemessene Anzahl und die zufällige Verteilung dieser Proteine, welche an der Immunantwort beteiligt sind, erlaubten allerdings keine robuste Quantifizierung.

5 Summary

Among others, in the agricultural and forestry sector it is very important to understand how plants react to pests. If we know the strength and the weakness within the immune response of plants we can give them preventive support and a more efficient cure. To prove the reaction of plants on the presence of pathogens we searched for differences of the protein constitution in the nuclear proteome. *Arabidopsis thaliana* plants were used as test objects. I was searching for proteins which induce reactions in the nucleus.

For this purpose the nuclei were isolated from the leaves. The quality of the isolated nuclei was controlled by DAPI staining and microscopy, SDS-PAGE and by the evaluation of the mass spectrometry results.

Partially two different projects were done in this work:

At first I tried to enrich phosphopeptides from the isolated nuclei. In one sample of three it was successful. The spectral count there was low because after the isolation of the nuclei less material for the phosphopeptide enrichment was left. One third of the identified proteins are phosphoproteins.

In the second project I compared the proteome from the nuclei of three test series of *Arabidopsis* plants. One was not treated; the other was treated with flg22 and another with elf18. The constitution of the proteins in the treated plants was compared with those in the untreated plants. Some differences were observed in the nuclear proteome. The test series with flg22 had as much proteins with significant higher spectral count as proteins with significant lower spectral count. The test series with elf18 had much more proteins with few spectral counts.

6 Zusammenfassung

Bei der Aufzucht von Pflanzen ist es unter anderem im Land- und Forstwirtschaftlichen Sektor besonders wichtig zu verstehen wie diese auf Schädlinge reagieren. Wenn man erkennt wo die Stärken und wo die Schwächen innerhalb der Immunantwort der Pflanze liegen, kann man diese besser prophylaktisch unterstützen oder effektiver behandeln. Um die Reaktion der Pflanzen auf die Anwesenheit von Pathogenen zu testen haben wir hierbei den Focus auf Unterschiede in der Proteinzusammensetzung des Zellkern Proteom gelegt. Als Versuchsobjekte dienten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Ich suchte nach Proteinen, welche im Zellkern Reaktionen hervorrufen sowie nach Proteinen, die im Zellkern anschließend gebildet werden.

Dazu mussten Zellkerne aus den Blättern isoliert werden. Die Qualität der isolierten Zellkerne wurde mittels DAPI-Färbung und Mikroskopie, SDS-PAGE und durch Auswertung der Ergebnisse der Massenspektrometrie überprüft.

In dieser Arbeit gab es zwei zum Teil unterschiedliche Projekte:

Zuerst wurde versucht aus den isolierten Zellkernen Phosphopetide anzureichern. Dieses gelang nur bei einer von drei Proben. Die Spektrenanzahl war hier sehr gering, da nach jeder Zellkernisolierung sehr wenig Material für eine Phosphopeptidanreicherung übrig blieb. Bei etwa einem Drittel der identifizierten Proteine handelte es sich um Phosphoproteine.

Im zweiten Projekt wurden die Proteome des Zellkerns von drei Versuchsreihen mit *Arabidopsis*-Pflanzen verglichen. Eine war unbehandelt, eine wurde mit flg22 und eine weitere mit elf18 behandelt. Die Proteinzusammensetzung der inokulierten Pflanzen wurde jeweils mit dem der unbehandelten Pflanzen verglichen. Es konnten einige Unterschiede im Proteom der Zellkerne beobachtet werden. Bei der Versuchsreihe mit flg22 war die Anzahl der Proteine mit signifikant höherer Spektrenanzahl etwa gleich groß wie jener mit signifikant geringerer Spektrenanzahl. Bei der Versuchsreihe mit elf18 war die Anzahl der Proteine mit signifikant niedrigerer Spektrenanzahl wesentlich höher.

7 Literatur

- [1] Abramovitch, R. B., Anderson, J. C., & Martin, G. B. (2010). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *NIH Public Access*, 7(8), 601–611.
- [2] Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207.
- [3] Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K. L., Ong, S., Lyon, C. E., Lamond, A. I., & Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 433(January), 77–83.
- [4] Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., et al. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977–983.
- [5] Bae, M. S., Cho, E. J., Choi, E.-Y., & Park, O. K. (2003). Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal*, 36(5), 652–663.
- [6] Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Mueller, M., Domon, B., & Aebersold, R. (2007). Reproducible isolation of distinct , overlapping segments of the phosphoproteome. *Nature*, 4(3), 231–237.
- [7] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- [8] Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803–814.
- [9] Eng, J.K., McCormack, A.L. & Yates, J.R., 1994. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *American Society Mass Spectrometry*, 5, pp.976–989.
- [10] Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 18(3), 265–276.

- [11] Fila, J., & Honys, D. (2012). Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids*, 43: 1025–1047.
- [12] Fink, J. L., Karunaratne, S., Mittal, A., Gardiner, D. M., Hamilton, N., Mahony, D., Kai, C., et al. (2008). Towards defining the nuclear proteome. *Genome biology*, 9(1), R15.
- [13] Folta, K. M., & Kaufman, L. S. (2006). Isolation of Arabidopsis nuclei and measurement of gene transcription rates using nuclear run-on assays. *Nature protocols*, 1(6), 3094–100.
- [14] Fu, Z. Q., Guo, M., Jeong, B. R., Tian, F., Elthon, T. E., Cerny RL, et al. (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, 447:284–288.
- [15] Goldman, a E., Moir, R. D., Montag-Lowy, M., Stewart, M., & Goldman, R. D. (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *The Journal of cell biology*, 119(4), 725–735.
- [16] Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in plant science*, 7(6), 251–256.
- [17] Grainger, R. J., & Beggs, J. D. (2005). Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA Society*, 11(5):533-57.
- [18] Groban, E. S., Narayanan, A., & Jacobson, M. P. (2006). Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS computational biology*, 2(4), e32.
- [19] Heazlewood, J. L., Verboom, R. E., Tonti-Filippini, J., Small, I., & Millar, a H. (2007). SUBA: the Arabidopsis Subcellular Database. *Nucleic acids research*, 35(Database issue), D213–8.
- [20] He, P., Shan, L., Lin, N.-C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., & Sheen, J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell*, 125(3), 563–575.
- [21] Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in Arabidopsis thaliana. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 279(3), 303–312.

- [22] Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074–1080.
- [23] Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- [24] Jørgensen, C., & Linding, R. (2008). Directional and quantitative phosphorylation networks. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 7(1), 17–26.
- [25] Kirchhoff, S. R., Gupta, S., & Knowlton, A. A. (2002). Cytosolic Heat Shock Protein 60, Apoptosis, and Myocardial Injury. *Circulation*, 105:2899-2904.
- [26] Knight, Z. a, Schilling, B., Row, R. H., Kenski, D. M., Gibson, B. W., & Shokat, K. M. (2003). Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nature biotechnology*, 21(9), 1047–1054.
- [27] Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *The Plant Cell*, 16(December), 3496–3507.
- [28] Li, H., & Luan, S. (2010). AtFKBP53 is a histone chaperone required for repression of ribosomal RNA gene expression in Arabidopsis. *Nature*, 20:357–366.
- [29] Li, S., & Dass, C. (1999). Iron(III)-immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry for the purification and characterization of synthetic phosphopeptides. *Analytical biochemistry*, 270(1), 9–14.
- [30] Mangeon, A., Junqueira, R. M., & Sachetto-Martins, G. (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav.*, 5(2): 99–104.
- [31] Mayer, M. P., & Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6):670–684.
- [32] Mortensen P., Gouw J.W., Olsen J.V., Ong S.E., Rigbolt K.T., Bunkenborg J., et al. (2010). MSQuant, an open source platform for mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Proteome Res.*, 9(1):393-403

- [33] Nicaise V., Joe A., Jeong B., Korneli C., Boutrot F., Westedt I., Staiger D., Alfano J., & Zipfel C. (2013) Pseudomonas HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *The EMBO Journal*, 32, 701–712
- [34] Nürnberger, T., & Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 318–324.
- [35] Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., Resing, K. a, et al. (2005). Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(10), 1487–1502.
- [36] Ong, S., Kratchmarova, I., & Mann, M. (2003). C-Substituted Arginine in Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *J. Proteome Res.*, 2: 173–181.
- [37] Rhee, S. Y. (2003). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 224–228.
- [38] Posewitz, M. C., & Tempst, P. (1999). Immobilized Gallium (III) Affinity Chromatography of Phosphopeptides peptides , as a front end to mass spectrometric analysis , the use of an immobilized metal affinity chromatography. *Anal. Chem.*, 71(14), 29520–29529.
- [39] Schulze, W. X. (2010). Proteomics approaches to understand protein phosphorylation in pathway modulation. *Current opinion in plant biology*, 13(3), 280–287.
- [40] Schulze, W. X., & Usadel, B. (2010). Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annual review of plant biology*, 61, 491–516.
- [41] Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M.-M., & Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(7), 473–483.
- [42] Tanz, S. K., Castleden, I., Hooper, C. M., Vacher, M., Small, I., & Millar, H. A. (2012). SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1185–1191.

- [43] Tschochner, H., & Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in Cell Biology*, 13(5), 255–263.
- [44] Turner, B. M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nature*, 9(1), 2–6.
- [45] Wolschin, F., Lehmann, U., Glinski, M., & Weckwerth, W. (2005). An integrated strategy for identification and relative quantification of site-specific protein phosphorylation using liquid chromatography coupled to MS2/MS3. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 19(24), 3626–3632.
- [46] Zhou, H., Watts, J. D., & Aebersold, R. (2001). A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nature biotechnology*, 19(4), 375–378.
- [47] Zipfel, C., & Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Current opinion in plant biology*, 8(4), 353–360.
- [48] Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749–760.

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Wolfram Weckwerth bedanken, der mir ermöglicht hat im Department für Molekulare Systembiologie (Ökogenomik und Systembiologie) eine spannende Masterarbeit zu finden. Großer Dank an Wolfgang Hoehenwarter für die Betreuung und Unterstützung.

Danke an euch beide, dass ihr mir die Möglichkeit und Zeit gegeben habt viele unterschiedliche Methoden in der Molekularbiologie kennen zu lernen und, dass ich meine zum Teil eingestaubten praktischen Laborerfahrungen wieder auffrischen durfte.

Ich danke Yanmei Chen für die Starthilfe bei der Phosphopeptidanreicherung. Danke auch an Yang Fan Qiu für die vielen praktischen Tipps bei der SDS-PAGE. Für die rasche Beantwortung spontaner Fragen im Labor ein großes Dankeschön an Luis Valledor, Luis Recuenco-Munoz, Takeshi Furuhashi, Anne-Mette Hanak und Lena Fragner.

Danke an Alexander Seidel und Lorenz Sauer für die Hilfe bei Problemen mit widerspenstiger Software.

Weiterer Dank an Irute Meskine für die Bereitstellung von flg22 und elf18.

Danke auch an Thomas Joch und Andreas Schröfl für die stetige Versorgung mit frischen Versuchspflanzen.

Besonderer Dank an Reinhard Turetschek für die Hilfestellungen und den seelischen Beistand in der Endphase meiner Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Departments für Molekulare Systembiologie (Ökogenomik und Systembiologie) für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken.

9 Anhang

9.1 Liste der identifizierten Proteine nach der Phosphopeptidanreicherung

Mascot Search Results, v2.2, BMB Mascotserver: 2003dellpe01.mpimp-golm.mpg.de

Database: Arabidopsis 20100909 (33011 sequences; 13229850 residues)

Protein hits

AT4G02510.1 TOC159 (PLASMID PROTEIN IMPORT 2)
AT2G39730.1 RCA (RUBISCO ACTIVASE)
AT1G01100.1 60S acidic ribosomal protein P1 (RPP1A)
AT4G31700.1 RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6); structural constituent of ribosome
AT2G43030.1 ribosomal protein L3 family protein
AT5G20290.1 40S ribosomal protein S8 (RPS8A)
AT5G65220.1 ribosomal protein L29 family protein
AT2G21660.1 ATGRP7 (COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 2); RNA binding / double-stranded DNA binding / si
AT5G10360.1 EMB3010 (EMBRYO DEFECTIVE 3010); structural constituent of ribosome
AT5G25980.1 TGG2 (GLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
ATCG00490.1 large subunit of RUBISCO.
AT2G27710.1 60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2B)
AT5G28540.1 BIP1; ATP binding
ATCG00780.1 encodes a chloroplast ribosomal protein L14, a constituent of the large subunit of the ribosomal c
AT4G34670.1 40S ribosomal protein S3A (RPS3aB)
AT4G22670.1 ATHIP1 (ARABIDOPSIS THALIANA HSP70-INTERACTING PROTEIN 1); binding
AT3G25520.1 ATL5 (A. THALIANA RIBOSOMAL PROTEIN L5); structural constituent of ribosome
AT2G41840.1 40S ribosomal protein S2 (RPS2C)
AT5G39740.1 60S ribosomal protein L5 (RPL5B)
AT5G20920.1 EIF2 BETA (EMBRYO DEFECTIVE 1401)
AT4G38970.1 fructose-bisphosphate aldolase, putative
AT3G15730.1 PLDALPHA1 (PHOSPHOLIPASE D ALPHA 1); phospholipase D
AT3G62870.1 60S ribosomal protein L7A (RPL7aB)
AT2G31610.1 40S ribosomal protein S3 (RPS3A)
AT1G48410.1 AGO1 (ARGONAUTE 1)
AT2G36160.1 40S ribosomal protein S14 (RPS14A)
AT1G20620.1 CAT3 (CATALASE 3); catalase
AT3G09630.1 60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4A)
AT3G53430.1 60S ribosomal protein L12 (RPL12B)
AT1G35680.1 50S ribosomal protein L21, chloroplast / CL21 (RPL21)
AT2G47610.1 60S ribosomal protein L7A (RPL7aA)
AT5G25780.1 EIF3B-2 (eukaryotic translation initiation factor 3B-2); nucleic acid binding / translation initia
AT2G38940.1 ATPPT2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2); carbohydrate transmembrane transporter/ phosphate transmembrane
AT4G11860.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G22960.1); similar to unnamed protein p
AT2G42740.1 RPL16A (ribosomal protein large subunit 16A); structural constituent of ribosome
AT5G45190.1 cyclin family protein
AT3G04840.1 40S ribosomal protein S3A (RPS3aA)
AT2G39460.1 ATRPL23A (RIBOSOMAL PROTEIN L23A); RNA binding / structural constituent of ribosome
AT1G72150.1 PATL1 (PATELLIN 1); transporter
AT3G55200.1 splicing factor, putative
AT3G49010.1 ATBBC1 (breast basic conserved 1); structural constituent of ribosome
AT4G31880.1 binding
AT2G40510.1 40S ribosomal protein S26 (RPS26A)
AT4G39260.1 ATGRP8/GR-RBP8 (COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 1, GLYCINE-RICH PROTEIN 8); RNA binding
AT1G22780.1 PFL (POINTED FIRST LEAVES); structural constituent of ribosome
AT1G07920.1 elongation factor 1-alpha / EF-1-alpha
AT1G07110.1 F2KP (FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE); fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase
AT2G04390.1 40S ribosomal protein S17 (RPS17A)
AT1G76810.1 eukaryotic translation initiation factor 2 family protein / eIF-2 family protein
AT1G55490.1 CPN60B (CHAPERONIN 60 BETA); ATP binding / protein binding / unfolded protein binding
AT4G24770.1 RBP31 (31-KDA RNA BINDING PROTEIN); RNA binding / poly(U) binding

AT3G15190.1 chloroplast 30S ribosomal protein S20, putative
 AT1G02780.1 EMB2386 (EMBRYO DEFECTIVE 2386); structural constituent of ribosome
 AT1G27400.1 60S ribosomal protein L17 (RPL17A)
 AT2G37190.1 60S ribosomal protein L12 (RPL12A)
 AT5G53440.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G56660.1); similar to hypothetical prot
 AT1G07660.1 histone H4
 AT5G55210.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G22320.1); similar to unnamed protein p
 AT1G33120.1 60S ribosomal protein L9 (RPL90B)
 AT1G20020.1 ATLFNR2 (LEAF FNR 2); NADPH dehydrogenase/ oxidoreductase/ poly(U) binding
 AT1G14320.1 60S ribosomal protein L10 (RPL10A) / Wilm's tumor suppressor protein-related
 AT1G20760.1 calcium-binding EF hand family protein
 AT2G43160.1 epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein
 AT1G16030.1 HSP70B (heat shock protein 70B); ATP binding
 AT3G44110.1 ATJ3 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 3)
 AT1G06680.1 PSBP-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 2); poly(U) binding
 AT1G21600.1 PTAC6 (PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE6)
 AT3G05060.1 SAR DNA-binding protein, putative
 AT3G06730.1 thioredoxin family protein
 AT3G45030.1 40S ribosomal protein S20 (RPS20A)
 AT3G55460.1 SCL30 (SC35-like splicing factor 30); RNA binding
 AT3G48930.1 EMB1080 (EMBRYO DEFECTIVE 1080); structural constituent of ribosome
 AT1G62750.1 ATSCO1/ATSCO1/CPEF-G/SCO1 (SNOWY COTYLEDON1); translation elongation factor/ translation factor, n
 AT1G43170.1 ARP1 (ARABIDOPSIS RIBOSOMAL PROTEIN 1); structural constituent of ribosome
 AT5G47210.1 nuclear RNA-binding protein, putative
 AT1G17210.1 zinc ion binding
 AT1G15690.1 AVP1 (vacuolar-type H⁺-pumping pyrophosphatase 1); ATPase
 AT5G54600.1 50S ribosomal protein L24, chloroplast (CL24)
 AT1G77180.1 chromatin protein family
 AT3G27830.1 RPL12-A (RIBOSOMAL PROTEIN L12-A); structural constituent of ribosome
 AT1G08880.1 G-H2AX/GAMMA-H2AX/H2AXA/HTA5; DNA binding
 AT1G04270.1 RPS15 (CYTOSOLIC RIBOSOMAL PROTEIN S15); structural constituent of ribosome
 AT4G04020.1 FIB (FIBRILLIN); structural molecule
 AT5G55300.1 TOP1BETA (DNA TOPOISOMERASE 1 BETA); DNA topoisomerase type I
 AT5G23740.1 RPS11-BETA (RIBOSOMAL PROTEIN S11-BETA); structural constituent of ribosome
 AT1G74050.1 60S ribosomal protein L6 (RPL6C)
 AT5G55660.1 GTP binding / RNA binding
 AT5G15200.1 40S ribosomal protein S9 (RPS9B)
 AT5G38640.1 eukaryotic translation initiation factor 2B family protein / eIF-2B family protein
 AT5G56030.1 HSP81-2 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 8); ATP binding
 AT1G18540.1 60S ribosomal protein L6 (RPL6A)
 AT5G66190.1 ATLFNR1 (LEAF FNR 1); NADPH dehydrogenase/ electron transporter, transferring electrons within the
 AT3G14310.1 ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3)
 AT2G45710.1 40S ribosomal protein S27 (RPS27A)
 AT2G38770.1 EMB2765 (EMBRYO DEFECTIVE 2765)
 AT1G70770.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G23170.1); similar to hypothetical prot
 AT3G49910.1 60S ribosomal protein L26 (RPL26A)
 AT1G79920.1 heat shock protein 70, putative / HSP70, putative
 AT1G53260.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G15000.1); similar to unnamed protein p
 AT1G42550.1 PMI1 (PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1)
 AT4G01310.1 ribosomal protein L5 family protein
 AT4G27090.1 60S ribosomal protein L14 (RPL14B)
 AT1G68790.1 LINC3 (LITTLE NUCLEI3)
 AT4G28080.1 binding
 AT3G05590.1 RPL18 (RIBOSOMAL PROTEIN L18); structural constituent of ribosome
 AT3G25920.1 RPL15 (ribosomal protein L15)
 AT1G09200.1 histone H3
 ATCG00830.1 encodes a chloroplast ribosomal protein L2, a constituent of the large subunit of the ribosomal co
 AT2G35410.1 33 kDa ribonucleoprotein, chloroplast, putative / RNA-binding protein cp33, putative
 AT4G32285.1 epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein / clathrin assembly protein-related

AT4G38550.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G20950.1); contains InterPro domain Pho
 AT4G15930.1 dynein light chain, putative
 AT4G20360.1 AtRABE1b/AtRab8D (Arabidopsis Rab GTPase homolog E1b); translation elongation factor
 AT3G48870.1 ATCLPC (CASEINOLYTIC PROTEASE C); ATP binding / ATPase
 AT5G55230.1 ATMAP65-1 (MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS 65-1); microtubule binding
 AT1G80660.1 AHA9 (Arabidopsis H(+)-ATPase 9); hydrogen-exporting ATPase, phosphorylative mechanism
 AT3G07110.1 60S ribosomal protein L13A (RPL13aA)
 AT1G49240.1 ACT8 (ACTIN 8); structural constituent of cytoskeleton
 CON_P00760 Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment) - Bos taurus (Bovine).
 AT3G24830.1 60S ribosomal protein L13A (RPL13aB)
 AT2G37220.1 29 kDa ribonucleoprotein, chloroplast, putative / RNA-binding protein cp29, putative
 AT4G15545.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G16520.1); similar to unnamed protein p
 AT3G02080.1 40S ribosomal protein S19 (RPS19A)
 AT2G02070.1 ATIDD5 (ARABIDOPSIS THALIANA INDETERMINATE(ID)-DOMAIN 5); nucleic acid binding / transcription fac
 AT1G09590.1 60S ribosomal protein L21 (RPL21A)
 AT4G17560.1 ribosomal protein L19 family protein
 AT4G29060.1 EMB2726 (EMBRYO DEFECTIVE 2726); translation elongation factor
 AT4G35380.1 guanine nucleotide exchange family protein
 AT3G50370.1 similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO71840.1); similar to hypothetical prote
 AT5G16270.1 ATRAD21.3/SYN4 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF RAD21 3)
 AT1G01790.1 KEA1 (K EFFLUX ANTIporter 1); potassium:hydrogen antiporter
 AT2G01250.1 60S ribosomal protein L7 (RPL7B)
 AT4G26630.1 GTP binding / RNA binding
 AT5G40950.1 RPL27; structural constituent of ribosome
 AT5G55950.1 transporter-related
 AT2G18020.1 EMB2296 (EMBRYO DEFECTIVE 2296); structural constituent of ribosome
 AT5G61210.1 SNAP33 (synaptosomal-associated protein 33); SNAP receptor
 AT3G10530.1 transducin family protein / WD-40 repeat family protein
 AT3G25070.1 RIN4 (RPM1 INTERACTING PROTEIN 4); protein binding
 AT5G63550.1 GTP binding / RNA binding
 AT3G27160.1 GHS1 (GLUCOSE HYPERSENSITIVE 1); structural constituent of ribosome
 AT5G58140.1 PHOT2 (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 1-LIKE); kinase
 AT5G14320.1 30S ribosomal protein S13, chloroplast (CS13)
 ATCG00900.1 encodes a chloroplast ribosomal protein S7, a constituent of the small subunit of the ribosomal co
 AT1G04480.1 60S ribosomal protein L23 (RPL23A)
 AT4G12420.1 SKU5 (skewed 5); copper ion binding
 AT3G13120.1 30S ribosomal protein S10, chloroplast, putative
 AT4G30690.1 translation initiation factor 3 (IF-3) family protein
 AT3G52150.1 RNA recognition motif (RRM)-containing protein
 AT3G08580.1 AAC1 (ADP/ATP CARRIER 1); ATP:ADP antiporter/ binding
 AT2G34310.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G29530.1)
 AT2G17360.1 40S ribosomal protein S4 (RPS4A)
 AT5G58420.1 40S ribosomal protein S4 (RPS4D)
 AT4G16720.1 60S ribosomal protein L15 (RPL15A)
 AT4G20390.1 integral membrane family protein
 AT4G34620.1 SSR16 (ribosomal protein S16); structural constituent of ribosome
 AT1G67090.1 RBCS1A; ribulose-bisphosphate carboxylase
 AT1G07790.1 HTB1; DNA binding
 AT1G62830.1 LDL1 (LSD1-LIKE1); amine oxidase
 AT5G49930.1 EMB1441 (EMBRYO DEFECTIVE 1441); nucleic acid binding
 AT1G64960.1 binding
 AT4G13350.1 human Rev interacting-like protein-related / hRIP protein-related
 AT1G25260.1 acidic ribosomal protein P0-related
 AT1G76180.1 ERD14 (EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 14)
 AT5G13920.1 zinc knuckle (CCHC-type) family protein
 AT3G01500.1 CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase/ zinc ion binding
 AT5G02970.1 hydrolase, alpha/beta fold family protein
 AT3G08530.1 clathrin heavy chain, putative
 AT2G41451.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G57200.1); similar to unnamed protein p

AT1G23410.1 ubiquitin extension protein, putative / 40S ribosomal protein S27A (RPS27aA)
 AT5G17420.1 IRX3 (IRREGULAR XYLEM 3, MURUS 10); cellulose synthase
 AT5G02560.1 HTA12; DNA binding
 AT2G45250.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G38280.1); similar to unknown [Populus]
 AT2G47500.1 microtubule motor
 AT5G27450.1 MK/MVK; mevalonate kinase
 ATCG00380.1 Chloroplast encoded ribosomal protein S4
 AT5G58160.1 actin binding
 AT5G62410.1 SMC2 (STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 2)
 AT5G45920.1 carboxylesterase
 AT1G08510.1 FATB (FATTY ACYL-ACP THIOESTERASES B); acyl carrier/ acyl-ACP thioesterase
 AT1G72180.1 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
 AT1G64790.1 binding
 AT1G08810.1 MYB60 (myb domain protein 60); DNA binding / transcription factor
 AT3G44730.1 kinesin motor protein-related
 AT2G41910.1 protein kinase family protein
 AT1G18080.1 ATARCA (Arabidopsis thaliana Homolog of the Tobacco ArcA); nucleotide binding
 AT5G56960.1 basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
 AT3G52380.1 CP33 (PIGMENT DEFECTIVE 322); RNA binding
 AT3G15120.1 AAA-type ATPase family protein
 AT5G39680.1 EMB2744 (EMBRYO DEFECTIVE 2744)
 AT4G12620.1 ATORC1B/ORC1B/UNE13 (ORIGIN OF REPLICATION COMPLEX 1B); DNA binding / protein binding
 AT1G31230.1 AK-HSDH/AK-HSDH I (ASPARTATE KINASE-HOMOSERINE DEHYDROGENASE I); aspartate kinase/ homoserine
 AT3G26940.1 CDG1 (CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1); kinase
 AT2G38040.1 CAC3 (acetyl co-enzyme A carboxylase carboxyltransferase alpha subunit); acetyl-CoA carboxylase
 AT4G35880.1 aspartyl protease family protein
 AT5G52310.1 COR78 (COLD REGULATED 78)
 AT2G47620.1 ATSWI3A (Arabidopsis thaliana switching protein 3A); DNA binding
 AT1G31812.1 ACBP (ACYL-COA-BINDING PROTEIN); acyl-CoA binding
 AT3G21950.1 S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein
 AT2G27505.1 similar to F-box family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G44950.1); contains InterPro domai
 AT1G21580.1 hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
 AT4G23140.1 CRK6 (CYSTEINE-RICH RLK 6); kinase
 AT4G08780.1 peroxidase, putative
 AT1G04940.1 TIC20; P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter
 AT5G17690.1 TFL2 (TERMINAL FLOWER 2)
 AT3G25050.1 XTH3 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 3); hydrolase, acting on glycosyl bonds
 AT3G30380.1 similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G01690.1); similar to unknown [Picea si

9.2 Liste der identifizierten Proteine für die Mikroben-Pflanzen-Interaktion

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# PSMs
AT1G07660.1	Histone superfamily protein	56,31	116
AT2G04520.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	47,59	42
AT2G21660.1	cold, circadian rhythm, and rna binding 2	43,75	90
AT2G23930.2	probable small nuclear ribonucleoprotein G	35,82	20
AT2G37190.1	Ribosomal protein L11 family protein	34,94	44
AT3G53430.1	Ribosomal protein L11 family protein	34,94	43
AT5G60670.1	Ribosomal protein L11 family protein	34,94	22
AT1G33120.1	Ribosomal protein L6 family	31,44	36
AT5G42060.1	DEK, chromatin associated protein	29,35	21
AT4G39260.1	cold, circadian rhythm, and RNA binding 1	27,81	42
AT2G35635.1	ubiquitin 7	26,62	54
AT5G02560.1	histone H2A 12	25,49	38
AT1G30230.1	Glutathione S-transferase, C-terminal-like; Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6	25,11	10
AT5G47210.1	Hyaluronan / mRNA binding family	24,93	79
AT5G65220.1	Ribosomal L29 family protein	24,28	67
AT4G27090.1	Ribosomal protein L14	23,88	11
AT2G20490.2	nucleolar RNA-binding Nop10p family protein	23,81	6
AT2G43030.1	Ribosomal protein L3 family protein	22,88	96
AT4G03520.2	Thioredoxin superfamily protein	22,22	10
AT1G03130.1	photosystem I subunit D-2	21,57	14
AT5G15970.1	stress-responsive protein (KIN2) / stress-induced protein (KIN2) / cold-responsive protein (COR6.6) / cold-regulated protein (COR6.6)	21,21	4
AT3G49010.4	breast basic conserved 1	21,08	20
AT4G21280.1	photosystem II subunit QA	21,08	42
AT3G52300.2	ATP synthase D chain, mitochondrial	20,49	28
ATCG00780.1	ribosomal protein L14	20,49	19
AT5G14320.2	Ribosomal protein S13/S18 family	21,00	32
AT4G40030.1	Histone superfamily protein	19,85	20
AT1G09200.1	histone H3	19,85	17
AT5G20290.1	Ribosomal protein S8e family protein	19,82	61
AT1G01100.3	60S acidic ribosomal protein family	19,79	66
AT1G20620.2	catalase 3	19,20	125
AT5G59950.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	18,85	46
AT1G15270.1	Translation machinery associated TMA7	18,75	8
AT4G16830.2	Hyaluronan / mRNA binding family	18,49	6
AT1G29250.1	Alba DNA/RNA-binding protein	18,46	10
AT2G34160.1	Alba DNA/RNA-binding protein	18,46	6
AT5G66190.2	ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	18,32	28
AT3G53890.1	Ribosomal protein S21e	18,29	4
ATCG01240.1	ribosomal protein S7	18,06	4
AT4G37090.2	unknown protein	17,93	16
AT1G14410.1	ssDNA-binding transcriptional regulator	17,87	22
AT3G03920.1	H/ACA ribonucleoprotein complex, subunit Gar1/Naf1 protein	17,82	27
AT3G49430.2	SER/ARG-rich protein 34A	17,51	40
AT4G30690.1	Translation initiation factor 3 protein	17,44	29
AT5G20920.2	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit	17,23	50
AT3G60770.1	Ribosomal protein S13/S15	17,22	8
AT2G05220.1	Ribosomal S17 family protein	17,14	41
AT2G15430.1	DNA-directed RNA polymerase family protein	16,93	10
AT3G55280.3	ribosomal protein L23AB	16,89	34
AT5G15520.1	Ribosomal protein S19e family protein	16,78	12
AT3G02080.1	Ribosomal protein S19e family protein	16,78	18
TRY1_BOVIN	Bovine trypsin - Bos taurus (Bovine).	16,46	58
AT3G05060.1	NOP56-like pre RNA processing ribonucleoprotein	16,32	61
AT3G09630.2	Ribosomal protein L4/L1 family	16,30	56

AT1G77710.1	unknown protein	16,13	1
ATCG00840.1	ribosomal protein L23.1	16,13	6
AT5G42020.2	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	15,99	135
AT3G62530.1	ARM repeat superfamily protein	15,84	4
AT1G03680.1	thioredoxin M-type 1	15,64	36
AT1G09340.1	chloroplast RNA binding	15,61	78
AT4G26110.2	nucleosome assembly protein1;1	15,60	34
AT2G39730.1	rubisco activase	15,40	160
AT5G30510.1	RPS1 (RIBOSOMAL PROTEIN S1); RNA binding / structural constituent of ribosome	15,38	29
AT3G05070.1	unknown protein	15,28	48
AT3G13200.1	EMB2769 (EMBRYO DEFECTIVE 2769)	15,22	18
AT2G19480.2	nucleosome assembly protein 1;2	15,01	56
AT2G37990.1	ribosome biogenesis regulatory protein (RRS1) family protein	14,78	22
AT5G25980.1	glucoside glucohydrolase 2	14,78	79
AT4G16720.1	Ribosomal protein L23/L15e family protein	14,22	22
AT1G52740.1	histone H2A protein 9	14,18	69
AT2G18740.2	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	14,10	8
AT5G27670.1	histone H2A 7	14,00	31
AT5G52470.1	fibrillarin 1	13,96	24
AT3G63490.1	Ribosomal protein L1p/L10e family	13,87	63
AT2G41840.1	Ribosomal protein S5 family protein	13,68	28
AT5G24490.1	30S ribosomal protein, putative	13,64	31
AT2G31410.1	unknown protein	13,57	12
AT1G12310.1	Calcium-binding EF-hand family protein	13,51	8
AT1G79850.1	ribosomal protein S17	13,42	17
AT1G71430.1	unknown protein	13,41	1
AT5G27120.1	NOP56-like pre RNA processing ribonucleoprotein	13,32	37
AT4G34620.1	small subunit ribosomal protein 16	13,27	19
AT5G40950.1	ribosomal protein large subunit 27	13,13	8
AT4G17520.1	Hyaluronan / mRNA binding family	13,06	32
AT5G02870.2	Ribosomal protein L4/L1 family	13,05	52
AT1G56110.1	homolog of nucleolar protein NOP56	13,03	44
AT3G47070.1	unknown protein	13,00	2
AT5G28540.1	heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	12,71	77
AT3G18790.1	unknown protein	12,67	24
AT2G41100.1	Calcium-binding EF hand family protein	12,65	52
AT3G25520.1	ribosomal protein L5	12,62	57
AT5G39570.1	unknown protein	12,60	6
AT3G11630.1	Thioredoxin superfamily protein	12,41	18
AT5G54640.1	RAT5 (RESISTANT TO AGROBACTERIUM TRANSFORMATION 5); DNA binding	12,31	5
AT3G27850.1	ribosomal protein L12-C	12,30	16
AT5G39740.1	ribosomal protein L5 B	12,29	24
AT1G54410.1	dehydrin family protein	12,24	8
AT3G07110.1	Ribosomal protein L13 family protein	12,14	15
AT5G10360.1	Ribosomal protein S6e	12,05	46
AT1G51510.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	11,88	7
AT3G52150.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	11,86	6
AT2G42540.1	cold-regulated 15a	11,81	4
AT1G18210.1	Calcium-binding EF-hand family protein	11,76	18
AT1G48350.1	Ribosomal L18p/L5e family protein	11,76	32
AT4G20360.1	ATRABE1B (ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG E1B); GTP binding / GTPase/ translation elongation factor	11,76	19
AT5G15550.2	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	11,69	46
AT1G13020.1	eukaryotic initiation factor 4B2	11,66	38
AT5G40490.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	11,58	18
AT1G77090.1	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	11,54	15
AT2G24060.1	Translation initiation factor 3 protein	11,54	38
AT1G48920.1	nucleolin like 1	11,49	33

AT5G09500.1	Ribosomal protein S19 family protein	11,33	12
AT4G18100.1	Ribosomal protein L32e	11,28	2
AT1G05190.1	Ribosomal protein L6 family	11,21	28
AT5G19510.1	Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein	11,16	12
AT5G06290.1	2-cysteine peroxiredoxin B	10,99	28
AT1G06680.2	photosystem II subunit P-1	10,96	25
AT3G48500.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	10,78	58
AT1G02780.1	Ribosomal protein L19e family protein	10,75	4
AT3G56240.1	copper chaperone	10,74	10
AT1G77180.1	chromatin protein family	10,60	42
AT4G29060.2	elongation factor Ts family protein	10,58	55
AT2G27710.1	60S acidic ribosomal protein family	10,43	32
AT1G20450.2	Dehydrin family protein	10,42	2
AT3G15360.1	thioredoxin M-type 4	16,00	14
AT4G21110.1	G10 family protein	14,00	22
AT2G38140.1	plastid-specific ribosomal protein 4	10,17	23
AT5G56950.1	nucleosome assembly protein 1;3	10,16	36
AT3G44890.1	ribosomal protein L9	10,15	18
AT5G47190.1	Ribosomal protein L19 family protein	10,04	10
AT5G14740.2	carbonic anhydrase 2	10,04	5
AT2G21330.2	fructose-bisphosphate aldolase 1	9,97	24
ATCG00830.1	ribosomal protein L2	9,85	40
AT3G27160.1	Ribosomal protein S21 family protein	9,84	14
AT1G07830.1	ribosomal protein L29 family protein	9,72	20
AT3G45030.1	Ribosomal protein S10p/S20e family protein	9,68	14
AT3G05560.1	Ribosomal L22e protein family	9,68	6
AT5G27770.1	Ribosomal L22e protein family	9,68	2
AT3G07590.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	9,65	10
AT3G26400.1	eukaryotic translation initiation factor 4B1	9,59	16
AT5G50920.1	CLPC homologue 1	9,47	65
AT3G12800.1	short-chain dehydrogenase-reductase B	9,40	22
AT1G10590.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	9,35	7
AT2G31610.1	Ribosomal protein S3 family protein	9,20	14
AT4G05180.1	photosystem II subunit Q-2	9,13	22
AT3G44590.2	60S acidic ribosomal protein family	9,01	2
AT5G41520.2	RNA binding Plectin/S10 domain-containing protein	8,96	9
ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha	8,88	27
AT5G52840.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase-related	8,88	6
AT5G14660.1	peptide deformylase 1B	8,79	6
AT3G50820.1	photosystem II subunit O-2	8,76	4
AT2G36160.1	Ribosomal protein S11 family protein	8,67	10
AT3G25920.1	ribosomal protein L15	8,66	36
AT4G38970.2	fructose-bisphosphate aldolase 2	8,40	36
AT4G01310.1	ribosomal protein L5 family protein	8,40	5
AT1G10522.1	unknown protein	8,38	28
AT1G50920.1	Nucleolar GTP-binding protein	8,35	6
AT5G39210.1	chlororespiratory reduction 7	8,33	8
AT2G47640.2	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	8,33	2
AT5G08180.1	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	8,33	2
AT4G18905.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	8,30	12
AT5G16620.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	8,28	17
AT3G04920.1	Ribosomal protein S24e family protein	8,27	8
ATCG00770.1	ribosomal protein S8	8,21	2
AT1G80230.1	Rubredoxin-like superfamily protein	8,19	4
AT2G28000.1	chaperonin-60alpha	8,19	49
AT5G03740.1	histone deacetylase 2C	8,16	40
AT5G45775.1	Ribosomal L5P family protein	8,14	18
AT2G37400.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	8,11	8
AT5G02500.2	heat shock cognate protein 70-1	8,06	12

AT4G35090.2	catalase 2	8,02	61
AT2G41430.1	dehydration-induced protein (ERD15)	7,98	6
AT1G14510.1	alfin-like 7	7,94	13
AT5G46020.1	unknown protein	7,93	4
ATCG00480.1	ATP synthase subunit beta	7,83	12
AT2G02470.1	alfin-like 6	7,81	7
AT1G76300.1	snRNP core protein SMD3	7,81	14
AT1G61150.3	LisH and RanBPM domains containing protein	7,77	4
AT2G44820.2	unknown protein	7,73	1
AT1G01090.1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha	7,71	18
AT5G03350.1	Legume lectin family protein	7,66	10
AT2G24440.1	selenium binding	7,65	4
AT4G18280.1	glycine-rich cell wall protein-related	7,64	1
AT5G51100.1	Fe superoxide dismutase 2	7,54	24
AT5G43960.2	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein with RNA binding (RRM-RBD-RNP motifs) domain	7,42	12
AT1G62750.1	Translation elongation factor EFG/EF2 protein	7,41	22
AT3G26060.1	Thioredoxin superfamily protein	7,41	19
AT5G13450.2	delta subunit of Mt ATP synthase	7,37	2
AT1G14320.2	Ribosomal protein L16p/L10e family protein	7,36	2
AT3G55670.1	unknown protein	7,34	1
AT3G45980.1	HTB9; DNA binding	7,33	3
AT3G04840.1	Ribosomal protein S3Ae	7,25	39
AT4G34670.1	Ribosomal protein S3Ae	7,25	25
AT1G10840.2	translation initiation factor 3 subunit H1	7,20	12
AT4G37930.1	serine transhydroxymethyltransferase 1	7,16	17
AT1G48610.2	AT hook motif-containing protein	7,07	2
AT4G26780.1	Co-chaperone GrpE family protein	7,03	6
AT2G47450.1	chloroplast signal recognition particle component (CAO)	6,97	16
AT1G43170.4	ribosomal protein 1	6,86	14
AT1G22300.3	general regulatory factor 10	6,77	1
AT5G14910.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	6,74	10
AT1G18080.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	6,73	37
AT4G34120.1	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	6,72	10
AT5G54600.2	Translation protein SH3-like family protein	6,70	40
AT5G38480.2	general regulatory factor 3	6,69	10
AT1G48620.1	high mobility group A5	6,68	6
AT3G18420.1	Protein prenyltransferase superfamily protein	6,65	17
AT3G62600.1	DNAJ heat shock family protein	6,65	2
AT1G52930.1	Ribosomal RNA processing Brix domain protein	6,56	2
AT4G29830.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	6,54	16
AT5G60980.1	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein with RNA binding (RRM-RBD-RNP motifs) domain	6,54	14
AT2G04495.1	unknown protein	6,44	14
AT5G15200.2	Ribosomal protein S4	6,41	5
AT3G07170.1	Sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein	6,40	2
AT1G48410.1	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	6,39	34
AT4G38550.1	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) family	6,37	18
AT1G35680.1	Ribosomal protein L21	6,36	38
AT1G52660.1	ATP binding	6,33	6
AT2G33450.1	Ribosomal L28 family	6,29	1
AT4G26555.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	6,28	8
AT5G13410.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	6,25	4
AT5G10010.1	unknown protein	6,22	6
AT3G16470.1	Mannose-binding lectin superfamily protein	6,21	2
AT2G44120.1	Ribosomal protein L30/L7 family protein	6,20	18
AT5G54430.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	6,20	3
AT2G01250.1	Ribosomal protein L30/L7 family protein	6,20	4
AT3G09440.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	6,16	14

AT3G13580.3	Ribosomal protein L30/L7 family protein	6,15	10
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK 1) (67 kDa cytoke- ratin) - Homo sapiens (Human). - [K2C1_HUMAN]	6,07	38
AT2G30695.1	unknown protein	6,03	3
AT3G12290.1	Amino acid dehydrogenase family protein	6,02	6
AT1G75040.1	pathogenesis-related gene 5	5,86	8
AT1G43010.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	5,84	6
AT2G42940.1	Predicted AT-hook DNA-binding family protein	5,84	2
AT4G02450.2	HSP20-like chaperones superfamily protein	5,83	14
AT3G11400.1	eukaryotic translation initiation factor 3G1	5,78	24
AT1G48830.1	Ribosomal protein S7e family protein	5,76	2
AT1G52980.1	GTP-binding family protein	5,73	8
AT3G17170.1	Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein	5,73	20
AT1G69200.1	fructokinase-like 2	5,68	22
ATCG00490.1	ribulose-bisphosphate carboxylases	5,64	17
AT1G11750.1	CLP protease proteolytic subunit 6	5,54	1
AT5G26742.1	DEAD box RNA helicase (RH3)	5,49	22
AT1G23860.3	RS-containing zinc finger protein 21	5,49	2
AT2G21870.2	copper ion binding;cobalt ion binding;zinc ion binding	5,45	14
AT1G66260.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	5,42	4
AT5G58710.1	rotamase CYP 7	5,39	2
AT4G27320.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	5,38	1
AT4G34980.1	subtilisin-like serine protease 2	5,37	32
AT2G25670.1	unknown protein	5,35	2
AT3G53970.1	proteasome inhibitor-related	5,30	8
AT1G22780.1	Ribosomal protein S13/S18 family	5,26	20
AT1G80750.1	Ribosomal protein L30/L7 family protein	5,26	10
AT2G02740.2	ssDNA-binding transcriptional regulator	5,24	14
AT2G43650.1	Sas10/U3 ribonucleoprotein (Utp) family protein	5,20	30
AT5G66540.1	unknown protein	5,15	20
AT5G25460.1	Protein of unknown function, DUF642	5,15	8
AT1G67430.1	Ribosomal protein L22p/L17e family protein	5,14	10
AT1G08450.2	calreticulin 3	5,14	6
AT3G22660.1	rRNA processing protein-related	5,12	17
AT1G07930.2	GTP binding Elongation factor Tu family protein	5,11	19
AT5G45070.1	AtPP2-A8 (Phloem protein 2-A8); carbohydrate binding	5,08	1
AT3G18080.1	B-S glucosidase 44	5,08	4
AT1G55480.1	protein containing PDZ domain, a K-box domain, and a TPR region	5,07	10
AT1G10580.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	5,06	18
AT3G07010.1	Pectin lyase-like superfamily protein	5,05	4
AT2G38730.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	5,03	2
AT1G07840.3	Sas10/Utp3/C1D family	5,02	5
AT3G07050.1	GTP-binding family protein	4,98	12
AT3G06730.1	Thioredoxin z	4,92	2
AT1G76010.1	nucleic acid binding	4,86	1
AT3G23990.1	heat shock protein 60	4,85	20
AT5G50250.1	chloroplast RNA-binding protein 31B	4,84	6
AT1G06190.2	Rho termination factor	4,79	2
AT2G38270.1	CAX-interacting protein 2	4,78	8
AT3G23620.1	Ribosomal RNA processing Brix domain protein	4,78	2
AT3G13224.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	4,76	2
AT4G21450.1	PapD-like superfamily protein	4,75	20
AT5G16130.1	Ribosomal protein S7e family protein	4,74	8
AT3G13470.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	4,70	18
AT5G08670.1	ATP synthase alpha/beta family protein	4,68	18
AT3G54090.1	fructokinase-like 1	4,67	14
AT2G18020.1	Ribosomal protein L2 family	4,65	20
AT2G33800.1	Ribosomal protein S5 family protein	4,62	18
AT3G24080.2	KRR1 family protein	4,60	4

AT3G58510.1	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	4,58	6
AT1G07360.1	CCCH-type zinc fingerfamily protein with RNA-binding domain	4,57	18
AT1G06460.1	alpha-crystallin domain 32.1	4,56	12
AT2G45330.2	RNA 2'-phosphotransferase, Tpt1 / KptA family	4,55	2
AT3G55620.1	Translation initiation factor IF6	4,49	2
AT3G15190.1	chloroplast 30S ribosomal protein S20, putative	4,46	7
AT4G20260.1	plasma-membrane associated cation-binding protein 1	4,44	8
AT1G80380.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	4,42	5
AT2G37340.3	arginine/serine-rich zinc knuckle-containing protein 33	4,42	8
AT2G42520.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	4,42	8
AT5G55280.1	homolog of bacterial cytokinesis Z-ring protein FTSZ 1-1	4,39	2
AT3G10060.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	4,35	12
AT5G16390.2	chloroplastic acetylcoenzyme A carboxylase 1	4,33	2
AT2G20060.1	Ribosomal protein L4/L1 family	4,33	2
AT2G46110.1	ketopantoate hydroxymethyltransferase 1	4,32	16
AT1G18450.1	actin-related protein 4	4,31	2
AT3G62870.1	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	4,30	14
AT1G09080.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	4,30	8
AT3G46970.1	PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2); phosphorylase/ transferase, transferring glycosyl groups	4,28	6
AT3G12140.1	emys N terminus domain-containing protein / ENT domain-containing protein	4,28	1
AT4G35450.4	ankyrin repeat-containing protein 2	4,28	6
AT4G02510.1	translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 159	4,26	26
AT4G24770.1	31-kDa RNA binding protein	4,26	12
AT1G25260.1	Ribosomal protein L10 family protein	4,26	2
AT3G61530.1	Phosphoenolpyruvate carboxylase family protein	4,24	14
AT5G26000.2	thioglucoside glucohydrolase 1	4,17	14
AT3G61620.1	3'-5'-exoribonuclease family protein	4,15	1
AT2G42500.1	protein phosphatase 2A-3	4,15	2
AT3G11820.2	syntaxin of plants 121	4,13	4
AT2G01750.1	microtubule-associated proteins 70-3	4,13	1
AT1G20020.2	ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2	4,00	10
AT5G53500.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	3,98	1
AT2G30050.1	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	3,97	16
AT4G00270.1	DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator	3,97	16
AT1G23280.1	MAK16 protein-related	3,96	6
AT5G09440.1	EXORDIUM like 4	3,96	8
AT2G33410.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	3,96	4
AT1G14650.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein / ubiquitin family protein	3,95	24
AT3G49601.1	unknown protein	3,89	6
AT1G72150.1	PATELLIN 1	3,84	6
AT1G69830.1	alpha-amylase-like 3	3,83	44
AT4G11010.1	nucleoside diphosphate kinase 3	3,78	18
AT5G02530.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	3,77	11
AT4G12610.1	transcription activators;DNA binding;RNA polymerase II transcription factors;catalytics;transcription initiation factors	3,75	1
AT1G72370.2	40s ribosomal protein SA	3,74	8
AT3G12780.1	phosphoglycerate kinase 1	3,74	4
AT4G20130.1	plastid transcriptionally active 14	3,73	14
AT1G64040.1	type one serine/threonine protein phosphatase 3	3,73	3
AT3G44750.2	histone deacetylase 3	3,72	1
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin 2e) (K2e) (CK 2e) - Homo sapiens (Human). - [K22E_HUMAN]	3,72	4
AT4G08580.1	microfibrillar-associated protein-related	3,68	4
AT3G01670.1	unknown protein	3,65	8
AT4G10710.1	global transcription factor C	3,63	19
AT2G47580.1	spliceosomal protein U1A	3,60	4
AT1G52410.1	TSA1 (TSK-ASSOCIATING PROTEIN 1); calcium ion binding / protein binding	3,58	1

AT3G23700.1	Nucleic acid-binding proteins superfamily	3,57	8
AT4G01700.1	Chitinase family protein	3,57	2
AT2G19520.1	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	3,55	4
AT2G33730.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	3,55	14
AT2G20760.1	Clathrin light chain protein	3,55	4
AT5G13020.1	Emsy N Terminus (ENT)/ plant Tudor-like domains-containing protein	3,53	2
AT4G14960.1	Tubulin/FtsZ family protein	3,51	16
AT3G44110.2	DNAJ homologue 3	3,50	16
AT3G13360.1	WPP domain interacting protein 3	3,49	1
AT5G57870.2	MIF4G domain-containing protein / MA3 domain-containing protein	3,48	9
AT3G62500.1	unknown protein	3,48	1
AT1G10060.3	branched-chain amino acid transaminase 1	3,46	1
AT3G52960.1	Thioredoxin superfamily protein	3,42	6
AT2G25690.1	Protein of unknown function (DUF581)	3,40	1
AT1G12800.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	3,39	16
AT1G48630.1	receptor for activated C kinase 1B	3,37	2
AT2G26280.1	CTC-interacting domain 7	3,35	2
AT4G25340.1	FK506 BINDING PROTEIN 53	3,35	10
AT3G04550.1	unknown protein	3,34	4
AT1G30470.1	SIT4 phosphatase-associated family protein	3,33	2
AT2G40360.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	3,32	12
AT5G07090.2	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein	3,28	4
AT5G35630.1	glutamine synthetase 2	3,26	14
AT1G52400.2	beta glucosidase 18	3,25	6
AT1G07320.3	ribosomal protein L4	3,24	16
AT4G00830.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	3,23	2
AT1G20960.1	U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase, putative	3,22	54
AT3G15730.1	phospholipase D alpha 1	3,21	10
AT5G63550.1	DEK domain-containing chromatin associated protein	3,21	1
AT2G43770.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	3,21	4
AT1G16610.2	arginine/serine-rich 45	3,19	2
AT3G19760.1	eukaryotic initiation factor 4A-III	3,19	2
AT5G41950.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3,19	2
AT2G30880.1	Pleckstrin homology (PH) domain-containing protein	3,17	6
AT5G44500.1	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	3,15	12
AT2G02160.1	CCCH-type zinc finger family protein	3,14	4
AT1G64880.1	Ribosomal protein S5 family protein	3,11	8
AT4G15900.1	pleiotropic regulatory locus 1	3,09	16
AT5G27640.1	translation initiation factor 3B1	3,09	6
AT3G55220.1	Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) A subunit protein	3,05	18
AT2G46280.1	TGF-beta receptor interacting protein 1	3,05	2
AT4G05410.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	2,98	8
AT5G55670.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	2,96	2
AT1G79330.1	metacaspase 5	2,93	6
AT3G58660.1	Ribosomal protein L1p/L10e family	2,91	2
AT2G38040.1	CAC3; acetyl-CoA carboxylase	2,86	10
AT1G56070.1	Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein	2,85	14
AT1G31870.1	unknown protein	2,85	2
AT4G23650.1	calcium-dependent protein kinase 6	2,84	6
AT5G20600.1	unknown protein	2,82	2
AT2G33150.1	peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	2,81	13
AT5G28040.1	DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator	2,81	16
AT4G16143.1	importin alpha isoform 2	2,80	20
AT3G52500.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	2,77	2
AT5G64420.1	DNA polymerase V family	2,76	20
AT3G60830.1	actin-related protein 7	2,75	2
AT2G34040.2	Apoptosis inhibitory protein 5 (API5)	2,71	16
AT1G16720.1	high chlorophyll fluorescence phenotype 173	2,68	2
AT4G12700.1	unknown protein	2,67	6

AT1G04850.1	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein	2,66	8
AT5G64200.1	ortholog of human splicing factor SC35	2,64	2
AT1G49750.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	2,63	12
AT4G27500.1	proton pump interactor 1	2,61	12
AT5G58470.1	TBP-associated factor 15B	2,61	16
AT3G01160.1	unknown protein	2,52	2
ATCG00190.1	RNA polymerase subunit beta	2,52	12
AT2G36250.1	Tubulin/FtsZ family protein	2,51	9
AT5G22490.1	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein	2,49	1
AT2G04842.1	threonyl-tRNA synthetase, putative / threonine--tRNA ligase, putative	2,46	10
AT1G13960.2	WRKY DNA-binding protein 4	2,46	2
AT3G18600.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2,46	2
AT1G63680.1	acid-amino acid ligases;ligases;ATP binding;ATP binding;ligases	2,46	4
AT1G21600.1	PTAC6 (PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE6)	2,44	1
AT5G35360.2	acetyl Co-enzyme a carboxylase biotin carboxylase subunit	2,40	7
AT3G53380.1	lectin protein kinase family protein	2,38	3
AT2G25970.1	KH domain-containing protein	2,37	2
AT5G67630.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2,35	2
AT3G18890.1	binding / catalytic/ coenzyme binding	2,34	1
AT2G34640.1	plastid transcriptionally active 12	2,28	12
AT1G07725.1	exocyst subunit exo70 family protein H6	2,28	1
ATCG00180.1	DNA-directed RNA polymerase family protein	2,21	2
AT3G60110.1	DNA-binding bromodomain-containing protein	2,18	1
AT1G31280.1	Argonaute family protein	2,17	26
AT2G20010.1	unknown protein	2,16	1
AT1G66280.1	Glycosyl hydrolase superfamily protein	2,10	4
AT1G50120.1	unknown protein	2,07	1
AT3G06810.1	acyl-CoA dehydrogenase-related	2,06	8
AT4G24680.1	modifier of snc1	2,03	4
AT3G42170.1	BED zinc finger ;hAT family dimerisation domain	2,01	4
AT5G56000.1	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	2,00	4
AT5G08610.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2,00	6
AT1G26110.2	decapping 5	1,98	2
AT1G62020.1	Coatomer, alpha subunit	1,97	2
AT4G26630.1	DEK domain-containing chromatin associated protein	1,97	2
AT3G26560.1	ATP-dependent RNA helicase, putative	1,97	8
ATMG01190.1	ATP synthase subunit 1	1,97	2
AT2G16940.1	Splicing factor, CC1-like	1,96	2
AT1G80070.1	Pre-mRNA-processing-splicing factor	1,91	14
AT4G39680.1	SAP domain-containing protein	1,90	2
AT2G13540.1	ARM repeat superfamily protein	1,89	6
AT5G14520.1	pescadillo-related	1,86	4
AT3G03710.1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase, putative	1,84	2
AT3G05420.1	acyl-CoA binding protein 4	1,80	6
AT2G17520.1	Endoribonuclease/protein kinase IRE1-like	1,78	1
AT1G79930.2	heat shock protein 91	1,77	6
AT4G36280.1	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein	1,76	2
AT5G35700.1	fimbrin-like protein 2	1,75	6
AT5G25230.1	Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein	1,75	2
AT1G50480.1	10-formyltetrahydrofolate synthetase	1,74	1
AT2G05920.1	Subtilase family protein	1,72	16
AT2G33340.1	MOS4-associated complex 3B	1,71	2
AT1G06230.1	global transcription factor group E4	1,70	2
AT3G21540.1	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	1,68	8
AT1G49760.1	poly(A) binding protein 8	1,64	12
AT3G09840.1	cell division cycle 48	1,61	6
AT5G37190.1	COP1-interacting protein 4	1,60	8
AT4G34110.1	poly(A) binding protein 2	1,59	10
AT4G24270.1	EMBRYO DEFECTIVE 140	1,59	2

AT4G35800.1	RNA polymerase II large subunit	1,58	12
AT4G24190.1	Chaperone protein htpG family protein	1,58	4
AT4G12770.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	1,57	2
AT2G24710.1	glutamate receptor 2.3	1,56	2
AT5G08450.1	unknown protein	1,53	2
AT5G66960.1	prolyl oligopeptidase family protein	1,52	4
AT4G11420.1	eukaryotic translation initiation factor 3A	1,52	6
AT2G29210.1	splicing factor PWI domain-containing protein	1,48	12
AT1G32415.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	1,45	1
AT1G10390.1	Nucleoporin autopeptidase	1,44	4
AT1G01790.1	K ⁺ efflux antiporter 1	1,42	2
AT1G09770.1	cell division cycle 5	1,42	2
AT5G42140.1	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain	1,40	2
AT1G75010.1	GTP binding	1,35	2
AT2G25140.1	casein lytic proteinase B4	1,35	1
AT5G64270.1	splicing factor, putative	1,34	14
AT1G29350.1	Kinase-related protein of unknown function (DUF1296)	1,32	2
AT5G55920.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	1,32	4
AT3G07660.1	Kinase-related protein of unknown function (DUF1296)	1,31	4
AT1G44910.2	pre-mRNA-processing protein 40A	1,30	4
AT1G07550.1	leucine-rich repeat protein kinase, putative	1,27	1
AT5G15450.1	CLPB3 (CASEIN LYTIC PROTEINASE B3); ATP binding / ATPase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding / protein binding	1,24	1
AT5G63420.1	RNA-metabolising metallo-beta-lactamase family protein	1,21	14
AT2G03150.1	ATP/GTP-binding protein family	1,19	2
AT3G24240.1	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	1,14	1
AT5G26160.1	unknown protein	1,13	1
AT5G13630.2	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH)	1,11	4
AT3G50370.1	unknown protein	1,11	2
AT3G04260.1	plastid transcriptionally active 3	1,10	2
AT1G59610.1	dynamamin-like 3	0,98	2
AT5G15280.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	0,98	1
AT2G32240.1	unknown protein	0,90	1
AT3G48770.1	ATP binding / DNA binding	0,90	1
AT5G17680.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	0,85	1
AT1G71220.1	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases;transferases, transferring hexosyl groups;transferases, transferring glycosyl groups	0,81	2
AT2G17060.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	0,67	1
AT3G11964.1	RNA binding	0,58	1
AT1G79280.1	nuclear pore anchor	0,53	2
AT4G02660.1	WD-40 repeat family protein / beige-related	0,43	1

9.3 Curriculum vitae

Ing. Roman Bauer, BSc

Geburtsdatum: 13. Juni 1981

Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung

seit 2013	Universität Wien, Masterstudium Ökologie
2007 - 2008	Auslandssemester in Rumänien (Erasmus)
2004 - 2013	Universität Wien, Studienrichtung Biologie Abschluss des Bachelorstudiums Biologie/Ökologie
1995 - 2000	HBLVA für chem. Industrie (Wien, Rosensteingasse)

Berufliche Tätigkeit

2013	Angestellter in der Abteilung Quality bei Baxter Healthcare GmbH
2011 - 2012	Tutor im Labor des Departments für Molekulare Systembiologie
2001 - 2004	Laborant in der Qualitätskontrolle der Octapharma Produktionsges.m.b.H.
2000 - 2001	Präsenzdienst, Bolfras-Kaserne Mistelbach

Sonstige Tätigkeiten

2010 - 2012	Tutor der Studienvertretung Biologie
2007 - 2013	Vertreter in unterschiedlichen Habilitations-, Personal- kommissionen und curriculären Arbeitsgruppen
2007 - 2009	Mandatar der Studienvertretung Biologie
seit 2006	Mitglied der Studienvertretung Biologie