



(12)

## Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **20 2022 107 272.8**  
(22) Anmeldetag: **28.12.2022**  
(47) Eintragungstag: **30.01.2023**  
(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **09.03.2023**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/04** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2018.01)  
**C12Q 1/686** (2018.01)  
**C12Q 1/6883** (2018.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:  
**Centurion University of Technology and Management, Bhubaneswar, Odisha, IN; Panigrahi, Gagan Kumar, Jatni, Odisha, IN; Sahoo, Annapurna, Nayagarh, Odisha, IN; Sahoo, Shraban Kumar, Sambalpur, Odisha, IN; Satapathy, Kunja Bihari, Bhubaneswar, Odisha, IN**

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:  
**Hohendorf Kierdorf Patentanwälte PartGmbB, 50672 Köln, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Ein System zur Analyse der Infektion mit Pseudomonas Syringae durch gezielte Ansprache von Cochaperonen, die eine J-Domäne enthalten**

(57) Hauptanspruch: System (100) zur Analyse der Infektion von Pseudomonas syringae pv. syringae mit der J-Domäne von Arabidopsis, wobei das System (100) Folgendes umfasst:

einen Behälter (102) zum Sammeln von Nicotiana benthamiana-Pflanzen, Wildtyp Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia-0 (Col-0), Transfer-Desoxyribonukleinsäure (T-DNA)-Insertionsmutanten ERdj3b-1 und Decapping Protein Factor 5 (dcp5-1);

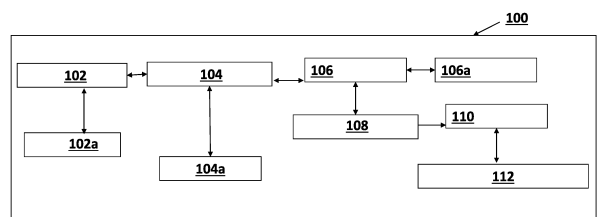
eine Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Kammer (104) die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte in den Donor-Vektor (pDONR207) auf der Grundlage der gesammelten DCP5- und der ERdj3B-Komplementär-DNA (cDNAs) in voller Länge unter Verwendung von Col-0-Ribonukleinsäure (RNA) durchführt, wobei eine Gateway-Rekombinationskammer (104a) Eintrittsklone, Expressionsklone und binäre Klone in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3010 transformiert werden;

eine Analysekammer (106) zur Analyse der durch den Bakterienstamm Pseudomonas syringae pv. syringae B728a (PssB728a) verursachten Pathogeninfektion nach Kultivierung des Flecks über Nacht bei 28°C im King's B Medium zusammen mit Spectinomycin und Rifampicin als Antibiotika, wobei der Bakterienstamm zur Bildung von Pellets zentrifugiert wird;

eine Kammer für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (108) für die Transformation der binären Klone, die DCP5 und ERdj3B entsprechen, in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm (GV3010), der anschließend in die Blätter von Nicotiana benthamiana agro-infiltriert wurde;

eine Genotypisierungskammer (110) zur Bestätigung der T-DNA-Insertionsmutanten erdj3b-1 und dcp5-1 und zur Extraktion von DNA und RNA aus den Blättern der Arabidopsis-Linien, wobei die RNA aus den Blättern unter Ver-

wendung von TRIzol-Reagenz extrahiert wird, wobei semi-quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung genspezifischer Primer für DCP5, ERdj3B und ACTIN durchgeführt werden, um das Vorhandensein/Abwesenheit von Transkripten in den mutierten Pflanzen zu bestätigen; und eine Proteinextraktions- und Immunoblotting-Kammer (112) zur Extraktion von Proteinen aus etwa 0.1 g Blättern von Nicotiana benthamiana-Pflanzen, die mit dem Agrobacterium tumefaciens-Stamm (GV3010) injiziert wurden, der die Proteinkonstrukte ERdj3B-CTAPi, GFP-CTAPi und DCP5-HA enthält, wobei die Blätter 48 Stunden nach der Injektion geerntet und zur Proteinextraktion zentrifugiert wurden.



**Beschreibung**

## BEREICH DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Gebiet der Vorbereitung von Strategien zur Verringerung der Auswirkungen einer Krankheit. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein System zur Analyse der Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* durch Überwachung der Arabidopsis J-Domäne, die Cochaperon und Decapping Protein Factor 5 enthält.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Pflanzen sind ständig abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Da Pflanzen physisch unbeweglich sind, verfügen sie über mehrere ausgeklügelte Mechanismen, um sich gegen die Stress auslösenden Reize zu wehren. Häufig wird die Konformation von Zellproteinen durch erhöhte Temperaturen stark beeinträchtigt, was zu einer Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen führt. Fehlgefaltete Proteine können die zelluläre Homöostase erheblich beeinträchtigen, wenn sie nicht durch das Proteinqualitätskontrollsystem verarbeitet werden. Obwohl das Protein-Qualitätskontrollsystem in allen zellulären Komponenten verankert ist, wird im Wesentlichen das endoplasmatische Retikulum (ER) mit fast 30 % der neu synthetisierten Proteine in Kontakt gebracht und gilt daher als wichtiger Kontrollpunkt für die Regulierung des Proteinfaltungsprozesses.

**[0003]** AU2011200744B2 offenbart Screening-Methoden zur Identifizierung von Cochaperon-Proteinen, die einen immunogenen Wert für verschiedene Krankheiten im Zusammenhang mit Proteinfehlfaltung in Pflanzen haben.

**[0004]** Zweifellos ist das ER daher mit einem umfassenden Mechanismus zur Kontrolle der Proteinqualität ausgestattet, der kontinuierlich den Faltungszustand neu übersetzter Proteine überwacht und so das Auftreten von Proteinfehlfaltung minimiert. Dieser Mechanismus zur Kontrolle der Proteinqualität gilt als einer der ausgeklügelten Mechanismen, die in erster Linie die Wärmetoleranz von Pflanzen begünstigen. Bei Hitzestress beherbergt das ER-Lumen fehlgefaltete oder ungefaltete Proteine, was zur Aktivierung des Protein-Qualitätskontrollprozesses führt, der durch einen Mechanismus vermittelt wird, der als Unfolded Protein Response (UPR) bekannt ist.

**[0005]** AU715662B2 gibt Aufschluss über das molekulare Schicksal des im ER lokalisierten Cochaperon-Proteins bei der Infektion mit einem Krankheitserreger in Pflanzen und bietet damit eine Strategie zur Überwachung der pflanzlichen Immunantwort zu

frühen Zeitpunkten der Infektion mit dem Krankheitserreger.

**[0006]** Der ER-Qualitätskontrollprozess wird hauptsächlich durch einige molekulare Chaperone wie Calreticulin, Calnexin und Immunglobulinbindendes Protein (BiP) vermittelt. BiP, auch bekannt als Hitzeschockprotein70 (Hsp70), spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Prozesses der Proteinqualitätskontrolle. Hsp70-Chaperone assoziieren und dissoziieren mit ihren kognitiven Proteinen, was durch einen ATP-vermittelten Prozess gesteuert wird. J-Domänenenthaltende Cochaperone (J-Proteine) sind die spezifischen Cofaktoren von Hsp70, die den durch Hsp70-Chaperone vermittelten Regulationsmechanismus begünstigen. J-Proteine interagieren spezifisch mit Hsp70. Es gibt drei luminal im ER lokalisierte J-Proteine: ERdj3A, ERdj3B und P58IPK in der Arabidopsis. Andererseits verfügen Eukaryoten über einen speziellen Überwachungsmechanismus, der in erster Linie die Boten-RNA (mRNA) überprüft und die abweichenden mRNAs gezielt abbaut. Der unphysiologische mRNA-Zerfall findet im Wesentlichen in zytoplasmatischen Foci statt, die als Processing Bodies (P-Bodies) bezeichnet werden. Überwiegend sind P-Körperchen auch an mehreren kritischen Prozessen wie dem mRNA-Decapping, der mRNA-Speicherung und der Translationsunterdrückung beteiligt, was die Bedeutung der P-Körperchen bei der Regulierung der mRNA-Translation unterstreicht. Bemerkenswerterweise kann diese Translationsunterdrückung wieder rückgängig gemacht werden, wenn wieder günstige Bedingungen herrschen, so dass die mRNAs wieder in die Translationsmaschinerie eingebunden werden, um ihre Übersetzung zu initiieren. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die den Prozessen in den P-Körpern zugrunde liegen, sind jedoch noch nicht bekannt. Der Prozess der Entkappung der mRNA ist ebenso bedeutsam, da dieses Ereignis den Prozess des mRNA-Zerfalls einleitet, während die mRNAs aufgrund des Fehlens der m7GDP-Kappe verschiedenen abbauenden Enzymen ausgesetzt sind.

**[0007]** In den oben genannten Werken wird nicht auf die Beteiligung von ERdj3B-Cochaperon und DCP5 an der Regulierung des Proteinfaltungsprozesses hingewiesen, die mit DCP5 in den P-Körpern verbunden sind.

**[0008]** Daher besteht die Notwendigkeit, ein System zur Analyse der Infektion von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mit Arabidopsis J Domain Containing Cochaperone and Decapping Protein Factor 5 (DCP5) zu entwickeln und die Dynamik von ERdj3B und DCP5 in Pflanzen unter pathogenen Bedingungen aufzuzeigen.

**[0009]** Der technische Fortschritt, der durch die vorliegende Erfindung offenbart wird, überwindet die Einschränkungen und Nachteile bestehender und konventioneller Systeme und Methoden.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf ein System zur Analyse der Infektion von Arabidopsis mit der J-Domäne von Pseudomonas syringae pv. syringae.

**[0011]** Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein System zur Analyse der Infektion von Pseudomonas syringae pv. syringae mit Arabidopsis J Domain und DCP5 bereitzustellen;

**[0012]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die Dynamik von ERdj3B und DCP5 in Pflanzen unter pathogenen Bedingungen zu untersuchen;

**[0013]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, zu zeigen, dass das ERdj3B-Cochaperon, das für seine Beteiligung an der Regulierung des Proteinfaltungsprozesses bekannt ist, mit dem DCP5 in den P-Körpern assoziiert; und

**[0014]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Verbindung zwischen der Proteinqualitätskontrolle, dem mRNA-Überwachungsprozess und vor allem der pflanzlichen Abwehrreaktion herzustellen.

**[0015]** In einer Ausführungsform ein System zur Analyse der Infektion von Pseudomonas syringae pv. syringae mit der J-Domäne von Arabidopsis, wobei das System Folgendes umfasst:

ein Behälter zum Sammeln von Nicotiana benthamiana-Pflanzen, Wildtyp Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia-0 (Col-0), Transfer-Desoxyribonukleinsäure (T-DNA)-Insertionsmutanten ERdj3b-1 und Decapping Protein Factor 5 (dcp5-1);

eine Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Kammer die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte in den Donor-Vektor (pDONR207) auf der Grundlage der gesammelten DCP5- und der ERdj3B-Komplementär-DNA (cDNAs) in voller Länge unter Verwendung von Col-0-Ribonukleinsäure (RNA) durchführt, wobei eine Gateway-Rekombinationskammer Eintrittsklone, Expressionsklone und binäre Klone in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3010 transformiert werden;

eine Analysekammer zur Analyse der durch den Bakterienstamm Pseudomonas syringae pv. syringae B728a (PssB728a) verursachten Pathogeninfektion nach Kultivierung des Flecks

über Nacht bei 28°C im King's B Medium zusammen mit Spectinomycin und Rifampicin als Antibiotika, wobei der Bakterienstamm zur Bildung von Pellets zentrifugiert wird;

eine Kammer für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zur Transformation der binären Klone, die DCP5 und ERdj3B entsprechen, in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm (GV3010), der anschließend in die Blätter von Nicotiana benthamiana agro-infiltriert wurde;

eine Genotypisierungskammer zur Bestätigung der T-DNA-Insertionsmutanten erdj3b-1 und dcp5-1 und zur Extraktion von DNA und RNA aus den Blättern der Arabidopsis-Linien, wobei die RNA aus den Blättern unter Verwendung von TRIzol-Reagenz extrahiert wird, wobei semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung genspezifischer Primer für DCP5, ERdj3B und ACTIN durchgeführt werden, um das Vorhandensein/Fehlen von Transkripten in den mutierten Pflanzen zu bestätigen; und

eine Proteinextraktions- und Immunoblotting-Kammer zur Extraktion von Proteinen aus etwa 0.1 g Blättern von Nicotiana benthamiana-Pflanzen, die mit dem Agrobacterium tumefaciens-Stamm (GV3010) injiziert wurden, der die Proteinkonstrukte ERdj3B-CTAPi, GFP-CTAPi und DCP5-HA beherbergt, wobei die Blätter 48 h nach der Injektion geerntet und zur Proteinextraktion zentrifugiert werden.

**[0016]** In einer Ausführungsform werden die Pflanzen in einer mit dem Behälter verbundenen Wachstumskammer ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  und  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80 % relative Luftfeuchtigkeit) mit einem Photoperiodenzyklus von 16 Stunden Tag/8 Stunden Nacht für die Entwicklungsanalyse und 12 Stunden Tag/12 Stunden Nacht für die pathophysiologische Analyse gezüchtet.

**[0017]** In einer Ausführungsform werden Wildtyp-Sequenzen (WT) von DCP5 und ERdj3B in Expressionsvektoren wie grün fluoreszierendes Protein (GFP), RFP, HA und CTAPi kloniert.

**[0018]** In einer Ausführungsform erzeugt die Gateway-Rekombinationskammer in vitro Assays, MBP- und GST-fusionierte Genfusionsproteine, wobei die erzeugten Fusionsproteine in Escherichia coli exprimiert werden.

**[0019]** In einer Ausführungsform wird der Bakterienstamm in einer mit der Analysekammer verbundenen Zentrifugalkammer 5-15 Minuten lang bei 4000-6000 U/min zentrifugiert und zweimal mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen.

**[0020]** In einer Ausführungsform werden die gebildeten Pellets mit 8-12 mM Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) resuspendiert und auf die Dichte von  $OD_{600}$  eingestellt.

**[0021]** In einer Ausführungsform werden Blätter der *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen von Hand mit der vorbereiteten Bakteriensuspension infiltriert, wobei die Blattproben zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min nach der Infektion) für Lokalisierungs- und Immunoblotting-Tests gesammelt werden.

**[0022]** In einer Ausführungsform werden die Blätter zwei Tage nach der Agroinfiltration mittels CLSM analysiert, wobei für den CLSM-Test die Konstrukte GFP, RFP und bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) verwendet werden.

**[0023]** In einer Ausführungsform besteht der Extraktionspuffer aus 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 100 mM Natriumchlorid (NaCl), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1X Proteinaseinhibitor, wobei das nach der Zentrifugation erhaltene Homogenat mit Protein-G-Magnetkügelchen (Invitrogen), die mit einem monoklonalen  $\alpha$ -HA-Antikörper beschichtet sind, für 1 h bei 4°C inkubiert wird.

**[0024]** In einer Ausführungsform wird der Immunkomplex fünfmal gewaschen, wobei der Inhalt nach dem Waschen in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für die anschließende Immunoblot-Analyse auf SDS-Polyacrylamid-Gele geladen wird.  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -PAP- und  $\alpha$ -UBQ-Antikörper wurden für Western Blotting verwendet, wobei MBP- und GST-Fusionsproteine in *Escherichia coli* exprimiert wurden, gefolgt von Pulldown-Assays, wobei die Immunoblot-Analyse unter Verwendung von  $\alpha$ -GST- und  $\alpha$ -MBP-Antikörpern durchgeführt wird.

**[0025]** Um die Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung weiter zu verdeutlichen, wird eine genauere Beschreibung der Erfindung durch Bezugnahme auf spezifische Ausführungsformen davon, die in den beigefügten Figuren dargestellt ist, gemacht werden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Figuren nur typische Ausführungsformen der Erfindung darstellen und daher nicht als Einschränkung ihres Umfangs zu betrachten sind. Die Erfindung wird mit zusätzlicher Spezifität und Detail mit den beigefügten Figuren beschrieben und erläutert werden.

#### Figurenliste

**[0026]** Diese und andere Merkmale, Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden besser verstanden, wenn die folgende detaillierte Beschreibung mit Bezug auf die beigefügten Figuren gelesen

wird, in denen gleiche Zeichen gleiche Teile in den Figuren darstellen, wobei:

**Fig. 1** ein Blockdiagramm eines Systems zur Analyse der Infektion von *Arabidopsis* mit der J-Domäne von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* zeigt, und

**Fig. 2** eine grafische Darstellung der Dynamik der Lokalisierung von DCP5-RFP in P-Körpern nach einer Infektion mit dem Pathogen (PssB728a) zeigt.

**[0027]** Der Fachmann wird verstehen, dass die Elemente in den Figuren der Einfachheit halber dargestellt sind und nicht unbedingt maßstabsgetreu gezeichnet wurden. Die Flussdiagramme veranschaulichen beispielsweise das Verfahren anhand der wichtigsten Schritte, um das Verständnis der Aspekte der vorliegenden Offenbarung zu verbessern. Darüber hinaus kann es sein, dass eine oder mehrere Komponenten der Vorrichtung in den Figuren durch herkömmliche Symbole dargestellt sind, und dass die Figuren nur die spezifischen Details zeigen, die für das Verständnis der Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung relevant sind, um die Figuren nicht mit Details zu überfrachten, die für Fachleute, die mit der vorliegenden Beschreibung vertraut sind, leicht erkennbar sind.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

**[0028]** Um das Verständnis der Erfindung zu fördern, wird nun auf die in den Figuren dargestellte Ausführungsform Bezug genommen und diese mit bestimmten Worten beschrieben. Es versteht sich jedoch von selbst, dass damit keine Einschränkung des Umfangs der Erfindung beabsichtigt ist, wobei solche Änderungen und weitere Modifikationen des dargestellten Systems und solche weiteren Anwendungen der darin dargestellten Grundsätze der Erfindung in Betracht gezogen werden, wie sie einem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung normalerweise einfallen würden.

**[0029]** Es versteht sich für den Fachmann von selbst, dass die vorstehende allgemeine Beschreibung und die folgende detaillierte Beschreibung beispielhaft und erläuternd für die Erfindung sind und diese nicht einschränken sollen.

**[0030]** Wenn in dieser Beschreibung von „einem Aspekt“, „einem anderen Aspekt“ oder ähnlichem die Rede ist, bedeutet dies, dass ein bestimmtes Merkmal, eine bestimmte Struktur oder eine bestimmte Eigenschaft, die im Zusammenhang mit der Ausführungsform beschrieben wird, in mindestens einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthalten ist. Daher können sich die Ausdrücke „in einer Ausführungsform“, „in einer anderen Ausführungsform“ und ähnliche Ausdrücke in dieser

Beschreibung alle auf dieselbe Ausführungsform beziehen, müssen es aber nicht.

**[0031]** Die Ausdrücke „umfasst“, „enthaltend“ oder andere Variationen davon sollen eine nicht ausschließliche Einbeziehung abdecken, so dass ein Verfahren oder eine Methode, die eine Liste von Schritten umfasst, nicht nur diese Schritte einschließt, sondern auch andere Schritte enthalten kann, die nicht ausdrücklich aufgeführt sind oder zu einem solchen Verfahren oder einer solchen Methode gehören. Ebenso schließen eine oder mehrere Vorrichtungen oder Teilsysteme oder Elemente oder Strukturen oder Komponenten, die mit „umfasst...a“ eingeleitet werden, nicht ohne weitere Einschränkungen die Existenz anderer Vorrichtungen oder anderer Teilsysteme oder anderer Elemente oder anderer Strukturen oder anderer Komponenten oder zusätzlicher Vorrichtungen oder zusätzlicher Teilsysteme oder zusätzlicher Elemente oder zusätzlicher Strukturen oder zusätzlicher Komponenten aus.

**[0032]** Sofern nicht anders definiert, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe die gleiche Bedeutung, wie sie von einem Fachmann auf dem Gebiet, zu dem diese Erfindung gehört, allgemein verstanden wird. Das System, die Methoden und die Beispiele, die hier angegeben werden, dienen nur der Veranschaulichung und sind nicht als Einschränkung gedacht.

**[0033]** Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden im Folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren im Detail beschrieben.

**[0034]** Fig. 1 zeigt ein Blockdiagramm eines Systems (100) zur Analyse einer *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-Infektion mit der J-Domäne von *Arabidopsis*, wobei das System (100) Folgendes umfasst: einen Behälter (102), eine Wachstumskammer (102a), eine Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Kammer (104), eine Gateway-Rekombinationskammer (104a), eine Analysekammer (106), eine Zentrifugierkammer (106a), eine Kammer für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (108), eine Genotypisierungskammer (110), eine Proteinextraktions- und Immunoblotting-Kammer (112).

**[0035]** Der Behälter (102) sammelt *Nicotiana Benthamiana* Pflanzen, Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Col-0), Transfer-Desoxyribonukleinsäure (T-DNA) Insertionsmutanten ERdj3b-1 und Decapping Protein Factor 5 (dcp5-1). Die Wachstumskammer (102a), die mit dem Behälter (102) für den Anbau von *Nicotiana Benthamiana*-Pflanzen verbunden ist, wird bei  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  und  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80 % relativer Luftfeuchtigkeit mit einem Photoperiodenzyklus von 16 Stunden Tag/8 Stunden Nacht für die

Entwicklungsanalyse und 12 Stunden Tag/12 Stunden Nacht für die pathophysiologische Analyse angebaut.

**[0036]** Die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Kammer (104) führt die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte in den Donor-Vektor (pDONR207) auf der Grundlage der gesammelten DCP5- und ERdj3B-Komplementär-DNA (cDNAs) in voller Länge unter Verwendung von Col-0-Ribonukleinsäure (RNA) durch, wobei eine Gateway-Rekombinationskammer (104a) Eintrittsklone, Expressionsklone und binäre Klone in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3010 transformiert werden. Die Wildtyp-Sequenzen (WT) von DCP5 und ERdj3B werden in Expressionsvektoren wie grün fluoreszierendes Protein (GFP), RFP, HA und CTAPi kloniert. Die Gateway-Rekombinationskammer (104a) erzeugt *in vitro* Assays, MBP- und GST-fusionierte Genfusionsproteine, wobei die erzeugten Fusionsproteine in *Escherichia coli* exprimiert werden.

**[0037]** Die Analysekammer (106) zum Analysieren einer durch den Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a) verursachten Pathogeninfektion nach Kultivierung des Flecks über Nacht bei  $28^\circ\text{C}$  im King's B-Medium zusammen mit Spectinomycin und Rifampicin als Antibiotika, wobei der Bakterienstamm zur Bildung von Pellets zentrifugiert wird. In der Zentrifugalkammer (106a), die mit der Analysekammer (106) verbunden ist, wird der Bakterienstamm 5-15 Minuten lang bei 4000-6000 U/min zentrifugiert und zweimal mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Die gebildeten Pellets werden mit 8-12 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und auf die OD<sub>600</sub>-Dichte eingestellt.

**[0038]** Die Kammer für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (108) für die Transformation der binären Klone, die DCP5 und ERdj3B entsprechen, in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (GV3010), der anschließend in die Blätter von *Nicotiana benthamiana* agro-infiltriert wird. Die Blätter der *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen werden von Hand mit der vorbereiteten Bakteriensuspension infiltriert, wobei die Blattproben zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min nach der Infektion) für Lokalisierungs- und Immunoblotting-Assays entnommen werden. Die Blätter werden zwei Tage nach der Agroinfiltration unter CLSM analysiert, wobei für den CLSM-Assay die GFP-, RFP- und bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) Konstrukte verwendet werden.

**[0039]** Die Genotypisierungskammer (110) zur Bestätigung der T-DNA-Insertionsmutanten erdj3b-1 und dcp5-1 und zur Extraktion von DNA und RNA aus den Blättern von *Arabidopsis*-Linien, wobei die RNA aus den Blättern unter Verwendung von TRI-

zol-Reagenz extrahiert wird, wobei semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung genspezifischer Primer für DCP5, ERdj3B und ACTIN durchgeführt werden, um das Vorhandensein/Fehlen von Transkripten in den mutierten Pflanzen zu bestätigen.

**[0040]** Die Proteinextraktions- und Immunoblotting-Kammer (112) zur Extraktion von Proteinen aus etwa 0.1 g Blättern von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen, die mit dem *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (GV3010) injiziert wurden, der die Proteinkonstrukte ERdj3B-CTAPi, GFP-CTAPi und DCP5-HA beherbergt, wobei die Blätter 48 h nach der Injektion geerntet und zur Proteinextraktion zentrifugiert werden. Der Extraktionspuffer besteht aus 20 mM Tris-Cl (pH 8,0), 100 mM Natriumchlorid (NaCl), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1X Proteinaseinhibitor, wobei das nach der Zentrifugation erhaltene Homogenat mit Protein G-magnetischen Beads (Invitrogen), die mit einem monoklonalen  $\alpha$ -HA-Antikörper beschichtet sind, für 1 h bei 4 °C inkubiert wird. Der Immunkomplex wird fünfmal gewaschen, wobei der Inhalt nach dem Waschen in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für die anschließende Immunoblot-Analyse auf SDS-Polyacrylamid-Gele geladen wird.  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -PAP- und  $\alpha$ -UBQ-Antikörper wurden für Western Blotting verwendet, wobei MBP- und GST-Fusionsproteine in *Escherichia coli* exprimiert wurden, gefolgt von Pulldown-Assays, wobei die Immunoblot-Analyse mit  $\alpha$ -GST- und  $\alpha$ -MBP-Antikörpern durchgeführt wird.

**[0041]** Arabidopsis ERdj3B und DCP5 sind hoch konservierte Proteine in verschiedenen Pflanzenarten: Die Proteinsequenz von Arabidopsis thaliana ERdj3B ist in verschiedenen Pflanzenarten hoch konserviert. Die Proteinsequenz von Arabidopsis ERdj3B weist im Vergleich zu anderen Pflanzenarten die höchste Anzahl vollständig konservierter Reste auf. Von den übrigen Aminosäureresten weist ein erheblicher Teil eine Ähnlichkeit von mehr als 70 % auf. Nur sehr wenige Aminosäurereste entsprechen einem nicht konservierten Segment. Auch im Fall von Arabidopsis thaliana DCP5 weisen mehrere Domänen ein Maximum an konservierten Aminosäureresten auf. So sind beispielsweise die DFDF-Domäne mit 453 bis 489 Resten und das FFD-Motiv mit 512 bis 527 Regionen über mehrere Pflanzenarten hinweg hoch konserviert. Interessanterweise sind die Arabidopsis-Proteine ERdj3B und DCP5 in verschiedenen Pflanzenarten extrem konserviert, was darauf hindeutet, dass sie alle mit diesen lebenswichtigen Proteinfaktoren ausgestattet sind, die an der Qualitätskontrolle von Proteinen und der Speicherung und Überwachung von mRNA beteiligt sind. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, so dass eine

Reihe von Pflanzen sie beherbergen, um wirksam gegen Stressbedingungen vorzugehen.

**[0042]** Die Loss-of-function-Mutanten von ERdj3B und DCP5 zeigen keine embryonalen letalen Phänotypen: Die Genotypisierung wird durchgeführt, um die T-DNA-Insertionsmutanten erdj3b-1 und dcp5-1 zu bestätigen. Die loss-of-function-Mutanten von ERdj3B und DCP5 sind nicht embryonal letal. Die erdj3b-1 zeigte einen ähnlichen Phänotyp, wenn sie bei 22°C unter Langtagsbedingungen (16/8 h Licht/Dunkel) wuchs. Bei höheren Temperaturen (28°C) war die Anzahl der von der Mutante produzierten Siliquen relativ geringer als bei der WT Col-0. Ansonsten war der Rosettenphänotyp im Vergleich zu WT Col-0 recht ähnlich. In ähnlicher Weise zeigt dcp5-1 einen relativ weniger stark beeinträchtigten Phänotyp und stimmt mit dem der WT Col-0 bei 22°C und 28°C unter Langtagsbedingungen (16/8 h Licht/Dunkel) überein. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Funktionsverlust von ERdj3B und DCP5 das Wachstum der Pflanze unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht wesentlich beeinträchtigt.

**[0043]** ERdj3B relokalisiert zu den P-Körpern und interagiert mit DCP5: ERdj3B und DCP5 lokalisieren sich hauptsächlich im Zytoplasma, im ER-Netzwerk bzw. in den P-Körpern, wenn sie in *Nicotiana benthamiana* vorübergehend exprimiert werden. Das überexprimierte Protein wird in den Blättern von *Nicotiana benthamiana* gut exprimiert. Anschließend wurde bei der Kolo-kalisierung von ERdj3B und DCP5 beobachtet, dass ERdj3B unter dem Einfluss von DCP5 zu den P-Körpern relokalisiert wird. Dies veranlasste uns, zu untersuchen, ob die Proteine physisch miteinander interagieren. Parallel zu den Ko-Lokalisierungsergebnissen interagieren die Proteine in den P-Körpern, was durch die BiFC-Analysen bestätigt wurde. Um die BiFC-Ergebnisse zu bestätigen, untersuchten wir die in vivo und in vitro Interaktion von ERdj3B und DCP5. Anschließend interagierten die Proteine unter in vivo und in vitro Bedingungen. Diese bisher unbekannte Interaktion zwischen ERdj3B und DCP5 deutet auf eine plausible Rolle von ERdj3B bei der mRNA-Verarbeitung oder Translationshemmung hin, die innerhalb der P-Körper stattfindet, wo DCP5 seine kanonische Funktion hat.

**[0044]** Pathogeninfektion führt zum proteolytischen Abbau von ERdj3B: Da eine bakterielle Infektion die pflanzliche Immunkaskade auslöst, werden die Proteinkonzentrationen sowohl von DCP5 als auch von ERdj3B in mit PssB728a infizierten Wildtyp-Blättern von *Nicotiana benthamiana* überwacht, um Veränderungen der Proteinkonzentration und der Lokalisierung bei einer bakteriellen Infektion festzustellen. Auffallend ist, dass der Proteingehalt von ERdj3B in den pflanzlichen Abwehrprozess involviert sein könnte, was noch nicht bekannt ist. Um zu untersuchen, ob die ERdj3B posttranslational abgebaut wer-

den, wurde MG132, ein Inhibitor des Proteasomkomplexes, zusammen mit PssB728a in Wildtyp-Blätter von *Nicotiana benthamiana* infiltriert, was zu keiner Zerstörung der ERdj3B führte. Der Proteingehalt von DCP5 wurde jedoch durch ähnliche Behandlungen wie bei ERdj3B nicht beeinflusst. Um zu bestätigen, dass der Zerfall des ERdj3B-Proteins während der PssB728a-Infektion über das Ubiquitin-26S-Proteasom-System (UPS) erfolgt, wurde das ubiquitinierte ERdj3B-Protein in o-HA-Immunitätspräzipitaten durch Immunoblot-Analyse mit einem  $\alpha$ -Ubiquitin (o-UBQ)-Antikörper überwacht. Die Ubiquitinierung von ERdj3B und UPF3 wurde bei 120 mpi stark induziert, was in erster Linie mit der Dynamik des ERdj3B-Proteins in Einklang steht.

**[0045]** Fig. 2 zeigt eine grafische Darstellung der Dynamik der Lokalisierung von DCP5-RFP bei einer Infektion mit dem Pathogen (PssB728a). Das DCP5 von *Arabidopsis* lokalisiert sich unter Bedingungen, die durch den Krankheitserreger (PssB728a) herausgefordert werden, unterschiedlich. Die Proteine wurden transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Weiße Pfeilspitzen weisen auf Signale von P-Körpern hin. Die Lokalisierung von DCP5 in *Arabidopsis* wurde zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet, u. a. 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten nach der Infektion (mpi). Die Anzahl der DCP5-induzierten P-Körper war bei 90 und 120 mpi signifikant rückläufig.

**[0046]** In erster Linie ist DCP5 eine der Schlüsselkomponenten, die am Decapping-Prozess der mRNA beteiligt sind, und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der P-Körper. DCP5 lokalisiert sich an den P-Körpern, wenn es vorübergehend in *Nicotiana benthamiana* exprimiert wird. Um die mögliche Verbindung zwischen DCP5-induzierten P-Körpern und der Pflanzenimmunität aufzudecken, werden die Blätter von *Nicotiana benthamiana* mit PssB728a angegriffen. Die Orchestrierung von DCP5-induzierten P-Körpern bei einer Pathogeninfektion wird untersucht. Auffallend war, dass 90 und 120 Minuten nach der Infektion ein erheblicher Rückgang der DCP5-assoziierten P-Körper zu verzeichnen war. Bemerkenswerterweise traten die DCP5-assoziierten P-Körper bei 150 mpi während 240 mpi wieder auf. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die physiologische Funktion von DCP5 nicht nur auf seinen Beitrag zur Entkappung von mRNA beschränkt ist, sondern auch mit dem pflanzlichen Abwehrprozess verbunden sein kann. Der Mechanismus, der dem Auf- und Abbau des P-Körpers zugrunde liegt, ist noch wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die Dynamik der Protein-Protein-Interaktion oder die Verfügbarkeit von mRNAs als Plattform für die Proteinbindung den Auf- und Abbau von P-Körpern vermittelt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Dynamik von DCP5, einer Schlüsselkomponente von P-Körpern, unter

pathogenen Bedingungen verändert wird. Der Abbau von DCP5-induzierten P-Körpern erfolgt nach der Immunaktivierung in Pflanzen. DCP5-induzierte P-Körper könnten bei der Regulierung des pflanzlichen Abwehrmechanismus eine wichtige Rolle spielen. Die Daten deuten darauf hin, dass es bei der Wahrnehmung von Krankheitserregern zu einer Modulation von DCP5-induzierten P-Körpern und einer Ubiquitinierung von ERdj3B kommt, und es wäre interessant, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzudecken.

**[0047]** Die Interaktion zwischen Pflanzen und Krankheitserregern führt zu einer dynamischen Transkriptom-Programmierung, die es den Pflanzen ermöglicht, sich den schädlichen Auswirkungen der eindringenden Krankheitserreger zu entziehen. Immunreaktive Gene der Pflanzen werden exprimiert, um einen robusten Verteidigungsprozess aufrechtzuerhalten, der sonst unter Bedingungen ohne Pathogenbefall nicht exprimiert wird. Es gibt vielschichtige transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, die die zelluläre Homöostase sicherstellen. Die im ER lokalisierten J-Proteine sind an mehreren zellulären Prozessen beteiligt und fungieren in erster Linie als funktioneller Partner von BiP. Die kanonische Funktion des Proteins ERdj3B besteht darin, an der Qualitätskontrolle von Proteinen mitzuwirken. Dennoch sind mehrere Funktionen des Cochaperons ERdj3B noch nicht aufgeklärt. Hier wurde festgestellt, dass dieses Cochaperon mit dem bekannten *Arabidopsis* DCP5 in den Prozessierungskörpern physisch interagiert. *Arabidopsis* DCP5 ist bekannt für seine Beteiligung an der Bildung und Aufrechterhaltung von P-Körpern und dem Decapping von mRNA. P-Body-Komponenten spielen eine wichtige Rolle bei der Reaktion von Pflanzen auf abiotischen Stress. Interessanterweise wurde bereits berichtet, dass DCP1, DCP2 und VCS zusammen den Decapping-Komplex bilden und zur postembryonalen Entwicklung beitragen. Obwohl DCP5 die gleiche Lokalisation wie DCP1, DCP2 und VCS hat, nämlich in den P-Körpern, ist das Fehlen von DCP5 nicht embryotödlich, was die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von DCP5 in Bezug auf die wichtigsten Dekapungsproteinfaktoren hervorhebt. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass DCP5 unter bestimmten Umständen unabhängig arbeitet und spezifische mRNAs ansteuert. Für die Funktion von DCP5 sind möglicherweise mehrere Proteinfaktoren erforderlich, die zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beitragen. ERdj3B und DCP5 sind für ihre Beteiligung an der Qualitätskontrolle von Proteinen bzw. an mRNA-Zerfallsprozessen bekannt; ihre Interaktion in den P-Körpern könnte einen größeren Einfluss haben, der noch aufzudecken ist, insbesondere ihre Beteiligung an den pflanzlichen Abwehrmechanismen.

**[0048]** Die Figuren und die vorangehende Beschreibung geben Beispiele für Ausführungsformen. Der Fachmann wird verstehen, dass eines oder mehrere der beschriebenen Elemente durchaus zu einem einzigen Funktionselement kombiniert werden können. Alternativ dazu können bestimmte Elemente in mehrere Funktionselemente aufgeteilt werden. Elemente aus einer Ausführungsform können einer anderen Ausführungsform hinzugefügt werden. Die Reihenfolge der hier beschriebenen Prozesse kann beispielsweise geändert werden und ist nicht auf die hier beschriebene Weise beschränkt. Darüber hinaus müssen die Handlungen eines Flussdiagramms nicht in der dargestellten Reihenfolge ausgeführt werden; auch müssen nicht unbedingt alle Handlungen ausgeführt werden. Auch können die Handlungen, die nicht von anderen Handlungen abhängig sind, parallel zu den anderen Handlungen ausgeführt werden. Der Umfang der Ausführungsformen ist durch diese spezifischen Beispiele keineswegs begrenzt. Zahlreiche Variationen sind möglich, unabhängig davon, ob sie in der Beschreibung explizit aufgeführt sind oder nicht, wie z. B. Unterschiede in der Struktur, den Abmessungen und der Verwendung von Materialien. Der Umfang der Ausführungsformen ist mindestens so groß wie in den folgenden Ansprüchen angegeben.

**[0049]** Vorteile, andere Vorzüge und Problemlösungen wurden oben im Hinblick auf bestimmte Ausführungsformen beschrieben. Die Vorteile, Vorzüge, Problemlösungen und Komponenten, die dazu führen können, dass ein Vorteil, ein Nutzen oder eine Lösung auftritt oder ausgeprägter wird, sind jedoch nicht als kritisches, erforderliches oder wesentliches Merkmal oder Komponente eines oder aller Ansprüche zu verstehen.

#### Bezugszeichenliste

100	Ein System zur Analyse der Pseudomonas Syringae Pv. Syringae Infektion mit Arabidopsis J Domain.
102	Behälter
102a	Wachstumschamber
104	Kammer für umgekehrte Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)
104a	Gateway-Rekombinationschamber
106	Analysechamber
106a	Zentrifugierchamber
108	Kammer für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
110	Kammer für Genotypisierung
112	Kammer für Proteinextraktion und Immunoblotting



**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- AU 2011200744 B2 [0003]
- AU 715662 B2 [0005]

### Schutzansprüche

1. System (100) zur Analyse der Infektion von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mit der J-Domäne von *Arabidopsis*, wobei das System (100) Folgendes umfasst:

einen Behälter (102) zum Sammeln von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen, Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Col-0), Transfer-Desoxyribonukleinsäure (T-DNA)-Insertionsmutanten ERdj3b-1 und Decapping Protein Factor 5 (dcp5-1);

eine Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Kammer (104) die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte in den Donor-Vektor (pDONR207) auf der Grundlage der gesammelten DCP5- und der ERdj3B-Komplementär-DNA (cDNAs) in voller Länge unter Verwendung von Col-0-Ribonukleinsäure (RNA) durchführt, wobei eine Gateway-Rekombinationskammer (104a) Eintrittsklone, Expressionsklone und binäre Klone in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3010 transformiert werden;

eine Analysekammer (106) zur Analyse der durch den Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a) verursachten Pathogeninfektion nach Kultivierung des Flecks über Nacht bei 28°C im King's B Medium zusammen mit Spectinomycin und Rifampicin als Antibiotika, wobei der Bakterienstamm zur Bildung von Pellets zentrifugiert wird;

eine Kammer für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (108) für die Transformation der binären Klone, die DCP5 und ERdj3B entsprechen, in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (GV3010), der anschließend in die Blätter von *Nicotiana benthamiana* agro-infiltriert wurde;

eine Genotypisierungskammer (110) zur Bestätigung der T-DNA-Insertionsmutanten erdj3b-1 und dcp5-1 und zur Extraktion von DNA und RNA aus den Blättern der *Arabidopsis*-Linien, wobei die RNA aus den Blättern unter Verwendung von TRIzol-Reagenz extrahiert wird, wobei semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung genspezifischer Primer für DCP5, ERdj3B und ACTIN durchgeführt werden, um das Vorhandensein/Abwesenheit von Transkripten in den mutierten Pflanzen zu bestätigen; und eine Proteinextraktions- und Immunoblotting-Kammer (112) zur Extraktion von Proteinen aus etwa 0.1 g Blättern von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen, die mit dem *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (GV3010) injiziert wurden, der die Proteinkonstrukte ERdj3B-CTAPi, GFP-CTAPi und DCP5-HA enthält, wobei die Blätter 48 Stunden nach der Injektion geerntet und zur Proteinextraktion zentrifugiert wurden.

2. System nach Anspruch 1, bei dem eine Wachstumskammer (102a), die mit dem Behälter (102) für das Wachstum von *Nicotiana Bentha-*

mian-Pflanzen verbunden ist, mit einem Photoperiodenzyklus von 16 Stunden Tag/8 Stunden Nacht für die Entwicklungsanalyse und 12 Stunden Tag/12 Stunden Nacht für die pathophysiologische Analyse gezüchtet wird ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  und  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80 % relative Feuchtigkeit).

3. System nach Anspruch 1, wobei Wildtyp-Sequenzen (WT-Sequenzen) von DCP5 und ERdj3B in Expressionsvektoren wie grün fluoreszierendes Protein (GFP), RFP, HA und CTAPi kloniert werden.

4. System nach Anspruch 1, wobei die Gateway-Rekombinationskammer (104a) in vitro Assays, MBP- und GST-fusionierte Genfusionsproteine erzeugt, wobei die erzeugten Fusionsproteine in *Escherichia coli* exprimiert werden.

5. System nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Zentrifugalkammer (106a), die mit der Analysekammer (106) verbunden ist, den Bakterienstamm bei 4000-6000 U/min für 5-15 Minuten zentrifugiert und zweimal mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen wird.

6. System nach Anspruch 5, wobei die gebildeten Pellets mit 8-12 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und auf die Dichte von OD<sub>600</sub> eingestellt werden.

7. System nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass Blätter der *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen mit der vorbereiteten Bakteriensuspension handinfiltriert werden, wobei die Blattproben zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min nach der Infektion) für Lokalisierungs- und Immunoblotting-Assays gesammelt werden.

8. System nach Anspruch 1, wobei die Blätter unter CLSM zwei Tage nach der Agroinfiltration analysiert werden, wobei für den CLSM-Assay die Konstrukte GFP, RFP und bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BIFC) verwendet werden.

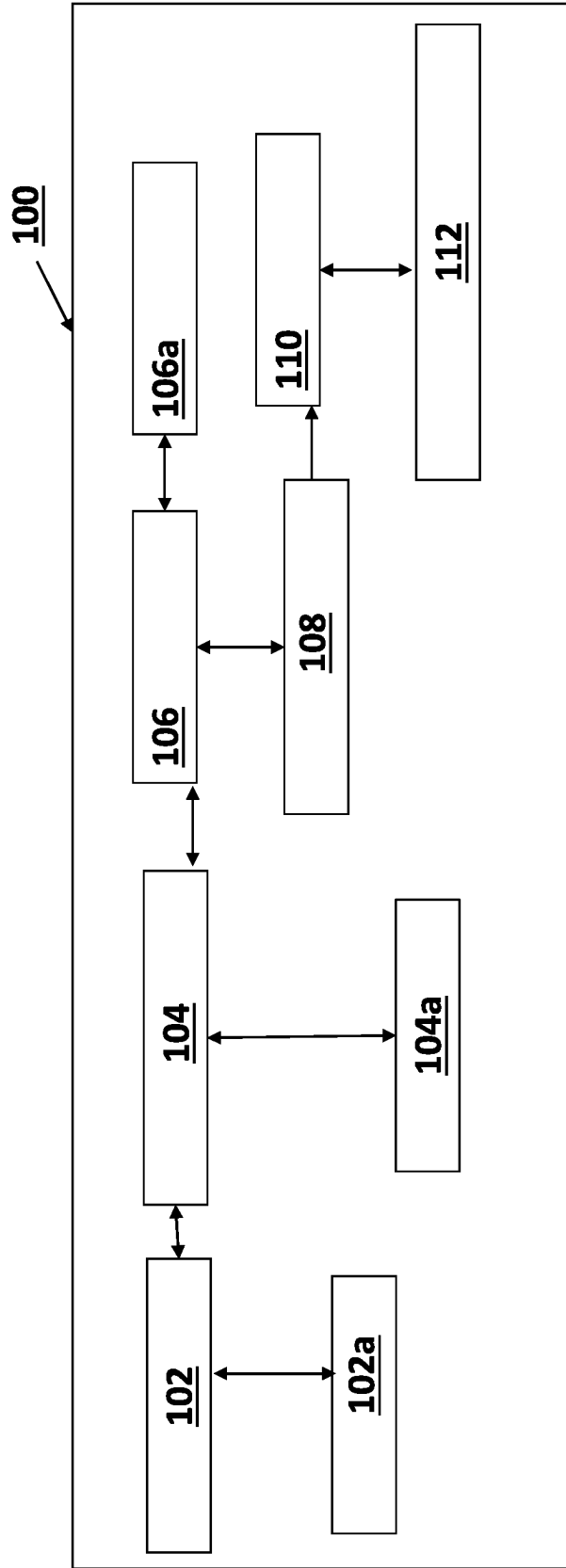
9. System nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Extraktionspuffer aus 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 100 mM Natriumchlorid (NaCl), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1X Proteinaseinhibitor, wobei das nach der Zentrifugation erhaltene Homogenat mit Protein-G-Magnetkügelchen (Invitrogen), die mit einem monoklonalen  $\alpha$ -HA-Antikörper beschichtet sind, für 1 h bei 4°C inkubiert wird.

10. System nach Anspruch 9, wobei der Immunkomplex fünfmal wiederholt gewaschen wird, wobei der Inhalt nach dem Waschen in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für die anschließende Immunob-

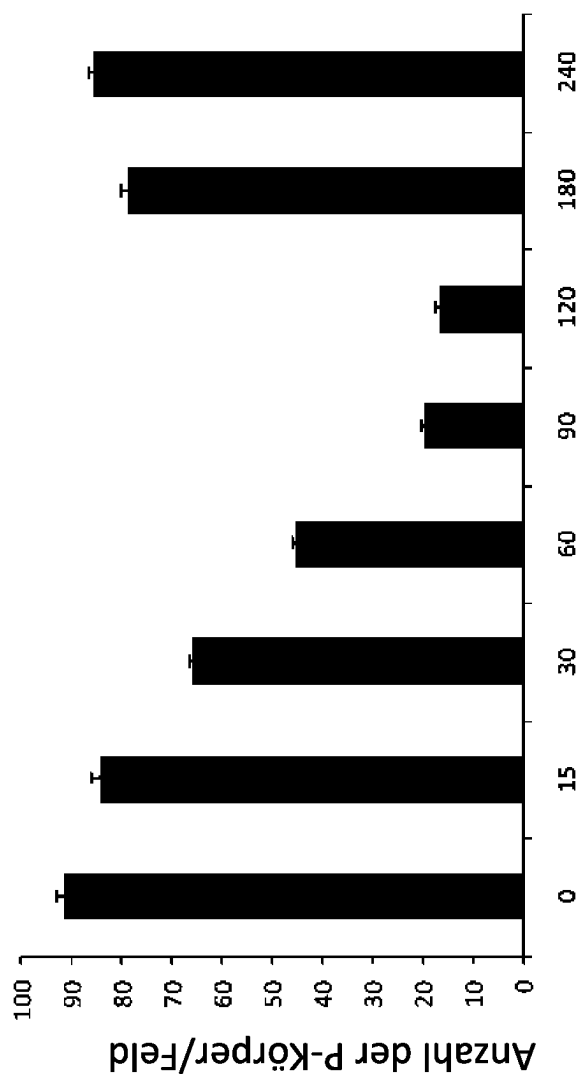
lot-Analyse auf SDS-Polyacrylamid-Gele geladen wird.  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -PAP- und  $\alpha$ -UBQ-Antikörper wurden für Western Blotting verwendet, wobei MBP- und GST-Fusionsproteine in Escherichia coli exprimiert wurden, gefolgt von Pulldown-Assays, wobei die Immunoblot-Analyse mit  $\alpha$ -GST- und  $\alpha$ -MBP-Antikörpern durchgeführt wird.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1



Figur 2