

Abstract

Abstract

The ability of multicellular organisms to sense environmental influences e.g. temperature and food sources and to respond to these appropriately is essential for their survival. In this scenario signal transduction plays a major role. One of the evolutionary oldest mechanisms of signal transduction is based on heterotrimeric G-proteins. The functional G-protein complex consists out of three subunits, the α -, β - and γ -subunit, and controls a variety of cellular processes such as the olfactory stimulus perception and others. Specific G-protein-coupled receptors (GPCRs) perceive external signals at the cell surface and initiate an intracellular signaling cascade, which is processed by heterotrimeric G-proteins and transmitted into the cell. The heterotrimeric G-protein complex together with its effector proteins are a central node of an exemplary signaling network, whose structure and function has been studied mainly in animal systems. In contrast, the characterization and functional analysis of these proteins in the plant system is hardly described. Neither a variety of GPCRs, nor the field of intracellular effectors of G-proteins have been described in detail. To gain a greater understanding of plant G-protein mediated processes, the aim of this work is the creation and analysis of a protein interaction network of plant G-proteins and their associated effectors.

Based on this idea, random screening approaches, using the yeast 2-hybrid technique, were performed. As the initiating step of this high-throughput approach, already known components of the plant G-protein complex were used. To gain knowledge of the interaction partners of G-proteins and their effector proteins the screening was carried out in an iterative way. Hence identified and verified interaction partners of the known components of the plant G-protein complex were included in all subsequent screening processes. This approach resulted in a protein interaction network, which may provide clues and hints regarding the prevailing G-protein dependent signaling pathways and a connection to a variety of biological processes in *Arabidopsis thaliana*. Thus, a subnetwork of the generated interaction data (69 proteins) was selected via the node degree and verified in collaboration with the laboratory of Dr. Alan Jones, by BiFC analysis in *Nicotiana benthamiana*. Additionally, the functional relationship among these proteins, which was mainly investigated by GO analyses, highlighted a set of individual candidates (AGB1, VAP27-1), which were investigated within glucose stress experiments and were examined in detail by mutated versions of the G-protein subunits. In further analysis of the identified protein interaction network, functional relationship to cell wall biosynthesis was observed. In addition specific interaction partners which have been placed into context with ER localization and ABA signaling were investigated in more detail.

Zusammenfassung

Die Fähigkeit Umwelteinflüsse wahrnehmen und entsprechend auf diese reagieren zu können, ist essentiell für das Überleben ein- und mehrzelliger Organismen. Hierbei spielt die Signalweiterleitung eine tragende Rolle. Einer der evolutionär ältesten Mechanismen der Signalverarbeitung basiert auf der Signalweiterleitung durch heterotrimere G-Proteine. Der funktionelle G-Proteinkomplex setzt sich aus drei Untereinheiten, der α -, β - und der γ -Untereinheit, zusammen und kontrolliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) perzipieren Signale an der Zelloberfläche und leiten eine intrazelluläre Signalkaskade ein, die über heterotrimere G-Proteine verarbeitet und weitergeleitet wird. Zusammen mit seinen Effektorproteinen stellt der heterotrimere G-Proteinkomplex daher einen zentralen Knotenpunkt eines exemplarischen Signalnetzwerkes dar. Der Aufbau und die Funktionsweise dieses Komplexes ist bisher vor allem in tierischen Systemen untersucht worden. Im Gegensatz dazu ist eine Charakterisierung und funktionelle Analyse von heterotrimeren G-Proteinen in pflanzlichen Systemen kaum erfolgt. Es wurde weder eine Vielzahl an GPCRs gefunden, lediglich ein möglicher Kandidat, noch wurden Effektorproteine eingehend untersucht. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, ein Proteininteraktionsnetzwerk pflanzlicher G-Proteine und ihrer Effektorproteine zu erstellen. Hiervon ausgehend wurde durch ungerichtete Hefe 2-Hybrid Screening-Ansätze versucht, die oben genannte Wissenslücke bezüglich der Effektorproteine der pflanzlichen G-Proteine zu schließen und Informationen zu möglichen biologischen Prozessen zu gewinnen. Auf Grundlage der bereits bekannten Komponenten des pflanzlichen G-Proteinkomplexes wurde begonnen, Proteine zu identifizieren, die direkt oder indirekt mit diesem bzw. den Untereinheiten interagieren. Um die Ansätze nicht nur auf die direkten Interaktionspartner der G-Proteine zu beschränken, wurde das Screening iterativ durchgeführt. Dies bedeutet, dass gefundene und verifizierte Interaktionspartner aus dem Screening erneut in dieses mit einbezogen wurden. Durch dieses Herangehen entstand ein Proteininteraktionsnetzwerk, welches Hinweise auf vorherrschende G-Protein vermittelte Signalwege und biologische Prozesse in *Arabidopsis thaliana* liefern kann. So wurde ein Subnetzwerk aus den generierten Interaktionsdaten (69 Proteine) über den Verknüpfungsgrad ausgewählt und in Zusammenarbeit mit Dr. Alan Jones mittels der BiFC Methode in *Nicotiana benthamiana* verifiziert. Anschließend wurden die Daten durch GO-Analysen in funktionellen Zusammenhang gesetzt und deuteten auf einen Einfluss der G-Proteine auf die Zellwandbiogenese hin. Außerdem stachen aus diesen Analysen einzelne Vertreter (AGB1, VAP27-1) hervor, die Mutmaßungen über einen funktionellen Zusammenhang zu ABA-abhängiger Signalweiterleitung erlauben.