

Regulation und Funktion von
AtCPK21 und *AtCPK23* in der
schnellen ABA-Signaltransduktion
und adaptiven abiotischen
Stressantwort

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anja Katarina Claire Liese

aus Berlin

2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2007 bis März 2012 an der Freien Universität Berlin, Abteilung Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von Prof.Dr.T.Romeis durchgeführt.

1. Gutachter: Prof.Dr.Tina Romeis

2. Gutachter: Prof. Dr.R.Mutzel

Disputation am 31.08.2012

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Allen bedanken, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Prof. Dr. Tina Romeis möchte ich dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Biochemie der Pflanzen an der FU Berlin durchführen durfte. Für Ihre Unterstützung und dafür, dass Sie mir ermöglicht hat meine Ergebnisse auch auf internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Prof. Dr. Rupert Mutzel gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Arbeitsgruppe Biochemie der Pflanzen möchte ich für die Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit, sowie für den richtigen Rat zur richtigen Zeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken die mich immer unterstützen; Jakob, Kai, Doreen, Katharina, meine Eltern und mein Großvater. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Allgemeines Abkürzungsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren	XV
Abkürzungsverzeichnis Nucleobasen der DNA	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Pflanzensignaltransduktion: Ca ²⁺ als sekundärer Botenstoff	1
1.2 Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase CDPK.....	2
1.2.1 CDPK-Proteinfamilie in <i>A. thaliana</i>	2
1.2.2 Biochemische Aktivierung von CDPKs	4
1.2.2.1 Die EF-Hand, ein Ca ²⁺ -Bindemotiv	4
1.2.2.1.1 Das EF-Hand-Paar.....	6
1.2.2.1.2 Ca ²⁺ -Selektivität bei der EF-Hand	7
1.2.2.2 Ca ²⁺ -abhängige Konformationsänderung von CDPKs	8
1.2.2.3 Autophosphorylierungsabhängige CDPK-Aktivität.....	10
1.3 Abiotischer Stress	11
1.3.1 Wassermangel als Teil des abiotischen Stresses mit Fokus auf osmotischem Stress	11
1.4 ABA, das Signalmolekül für abiotischen Stress	13
1.4.1 Funktion der ABA.....	13
1.4.2 Der ABA-Rezeptor und die ABA-Signaltransduktion	14
1.4.3 ABA-abhängige Regulation der Stomata.....	18
1.5 Genregulation in Abhängigkeit von ABA und abiotischem Stress	19
1.6 CDPKs in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort	21
1.7 Zielsetzungen	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Chemikalien	28
2.1.2 Verwendete Enzyme, Proteine, Peptide, Antikörper und Größenstandards.....	28
2.1.3 Verwendete Medien	29
2.1.4 Verwendete <i>E.coli</i> -Stämme.....	29
2.1.5 Verwendete Pflanzenlinien.....	30
2.1.6 Vektoren und Plasmide	31
2.1.7 Verwendete Programme	35
2.2 Methoden.....	35

2.2.1	Methoden zum Arbeiten mit <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	35
2.2.1.1	Anzucht und Selektion von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	35
2.2.1.2	<i>A. thaliana</i> -Samen-Sterilisierung	36
2.2.1.3	Stressversuche an <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	36
2.2.1.4	Herstellung von Polyethylenglycol- (PEG-) Platten nach (Verslues et al. 2006).....	37
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	37
2.2.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	37
2.2.2.2	Hitzeschocktransformation chemokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen (DH10B/BL21 DE3).....	37
2.2.2.3	Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen (DH10B/BL21 DE3)	38
2.2.3	Molekularbiologische Methoden – Nukleinsäuren	38
2.2.3.1	<i>E.coli</i> -Plasmid-DNA-Minipräparation	38
2.2.3.2	<i>E.coli</i> -Plasmid-DNA-Maxipräparation	38
2.2.3.3	DNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i> nach (Edwards et al. 1991)	38
2.2.3.4	RNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i> mit der Trizol-Methode nach (Chomczynski und Sacchi 2006)	39
2.2.3.5	DNase-Behandlung der RNA	39
2.2.3.6	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	40
2.2.3.7	Polymerase Chain Reaction (PCR) nach (Mullis et al. 1992).....	40
2.2.3.8	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.3.9	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	41
2.2.3.10	Aufreinigung eines PCR-Produkts.....	41
2.2.3.11	Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration	41
2.2.4	Klonierung.....	41
2.2.4.1	Restriktionsverdau von Plasmiden	44
2.2.4.2	Dephosphorylierung	44
2.2.4.3	Ligation	45
2.2.4.4	Mutagenese-PCR nach (Weiner et al. 1994)	45
2.2.4.5	Sequenzierung der DNA	46
2.2.5	Molekulare Methoden – Protein	46
2.2.5.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> unter Verwendung eines IPTG-induzierbaren Systems	46
2.2.5.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	46
2.2.5.3	GST-Aufreinigung	47
2.2.5.4	Aufreinigung der CPK21-CLD für „Surface Plasma Resonance“- (SPR-) Interaktionsanalysen	48
2.2.5.4.1	Aufreinigung His-markierter Proteine	49

2.2.5.4.2	Entfernung der His-Markierung durch die Protease Thrombin.....	49
2.2.5.4.3	Phenylsepharose	50
2.2.5.4.4	Umpufferung über eine Entsalzungssäule.....	50
2.2.5.4.5	Protein-Aufkonzentrierung durch Größenausschlussfiltration	50
2.2.5.4.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	51
2.2.5.5	Transiente Protein-Expression in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten	51
2.2.5.6	<i>pRD29B::LUC</i> -Expressionsmessungen nach Yoo et al. (2007)	53
2.2.5.7	Zellaufschluss von <i>A. thaliana</i> -Protoplasten und Strep-Affinitätschromatografie.....	53
2.2.5.8	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.2.5.9	Coomassie-Färbung.....	55
2.2.5.10	Färbungen „Sypro® Ruby“ und „ProQ® Diamond“	55
2.2.5.11	Western-Blot	55
2.2.5.12	Immunodetektion.....	55
2.2.5.13	Färbung von Membranen mit dem Ponceaus-S-Farbstoff	57
2.2.6	Enzymaktivitätsmessungen.....	58
2.2.6.1	Kinaseaktivitätsmessungen.....	58
2.2.7	Interaktionsstudien.....	58
2.2.7.1	SLAC1-CPK23-Coimmunpräzipitationen.....	58
2.2.7.2	LerCDPK-ABI2-Coimmunpräzipitationen.....	59
2.2.7.3	„Surface Plasmon Resonance“- (SPR-) Interaktionsstudien	60
2.2.7.3.1	Immobilisierung des Peptids 21P1	60
2.2.7.3.2	Messung des SPR-Signals.....	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Analyse der <i>in vivo</i> Funktion der CPK21 und CPK23	61
3.1.1	Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien der <i>CPK21</i> und <i>CPK23</i>	61
3.1.1.1	Bestimmung des T-DNA-Insertionsortes für die T-DNA-Linie mit Insertionsereignis in <i>CPK21</i> (SALK_029412).....	61
3.1.1.2	Bestimmung des T-DNA-Insertionsortes für die T-DNA-Linie mit Insertionsereignis in <i>CPK23</i> (SALK_007958).....	63
3.1.1.3	Untersuchungen eines Resttranskripts in der <i>cpk23-1</i> -Mutante.....	64
3.1.2	Phänotypische Untersuchung der <i>cpk21-1</i> unter hyperosmotischen Stressbedingungen.....	65
3.1.3	Analyse der abiotischen Stress- und ABA-abhängigen Markergene in <i>cpk21-1</i> und <i>cpk23-1</i>	67
3.1.4	Untersuchung der Funktion der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion	70

3.1.4.1	Analyse des Einflusses der CPK21 und CPK23 auf die Expression von <i>RD29B</i>	70
3.1.4.1.1	Untersuchung der <i>RD29B</i> -Expression in <i>cpk21-1</i> - und <i>cpk23-1</i> -Protoplasten	71
3.1.4.1.2	Untersuchung des Einflusses von CPK23 auf die ABA- und RCAR1-abhängige <i>RD29B</i> -Expression.....	72
3.1.4.1.3	Untersuchung des Einflusses der CPK21 auf die ABA- und RCAR1-abhängige <i>RD29B</i> -Expression.....	73
3.1.4.2	Interaktions- und regulatorische Analyse mit anderen Komponenten der ABA-Signaltransduktion	75
3.1.4.2.1	Interaktionsstudien einer CPK23 homologen LerCDPK mit ABI2	76
3.1.4.2.2	Slow- (langsame) Anionenkanäle als <i>in vivo</i> Interaktoren der CPK21 und CPK23.....	77
3.1.4.2.3	Interaktionsanalysen der CPK23 mit NT-SLAC1	78
3.1.4.2.4	Nachweis der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von NT-SLAH3 durch CPK21 ..	79
3.2	Biochemische Charakterisierung der CPK21 und CPK23	81
3.2.1	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der <i>in vitro</i> Kinaseaktivität der CPK23 und CPK21	81
3.2.2	CPK23 eine Ca ²⁺ -abhängige Kinase? Sequenzvergleich der CPK21 und CPK23	82
3.2.2.1	Vergleich der calmodulinähnlichen Domäne.....	83
3.2.2.2	Vergleich des Pseudosubstratsegments	84
3.2.3	In dieser Arbeit verwendete CPK21- und CPK23-Chimären und Punktmutationskonstrukte.....	87
3.2.4	Ca ²⁺ -abhängige Kinaseaktivität-CPK23::21-CLD-Chimäre und Punktmutanten in der EF-Hand 1 und dem Pseudosubstratsegment.....	88
3.2.5	Untersuchung des Ca ²⁺ -abhängigen Laufverhaltens in der SDS-Gelelektrophorese.....	91
3.2.5.1	Analyse des Ca ²⁺ -abhängigen Laufverhaltens im SDS-Gel einer CPK21-inaktiven Variante und der CPK21-CLD	92
3.2.5.2	Untersuchung des Ca ²⁺ -abhängigen Laufverhaltens im SDS-Gel der CPK23:21-CLD-Chimäre.....	93
3.2.6	Untersuchung des (Auto-) Phosphorylierungszustands in <i>E.coli</i> -exprimierten CPK23-Varianten.....	93
3.2.7	Analyse der CPK23-Varianten mit degenerierten EF-Hand-Motiven	95
3.2.8	Ca ²⁺ -abhängige intramolekulare Interaktion zwischen dem Pseudosubstratsegment und der CLD der CPK21	97
4	Diskussion.....	100
4.1	Aktivierung von CDPKs in Abhängigkeit von Ca ²⁺	100
4.1.1	Ist CPK23 eine Ca ²⁺ -abhängige Kinase?	100
4.1.1.1	Die Ca ²⁺ -Bindemotive der CPK23	100

4.1.1.2	Die EF-Hand 1 als Ca ²⁺ -Bindemotiv in der CPK23	100
4.1.1.3	CPK23-CLD	102
4.1.1.4	Funktionalität der CPK23-EF-Hände	103
4.1.2	Pseudosubstratsegment	105
4.1.2.1	Pseudosubstratsegment der CPK23	105
4.1.2.2	Interaktionsstudien zum Pseudosubstratsegment und zur CLD.....	106
4.1.3	Regulierung der CPK23-Aktivität durch Phosphorylierung	108
4.1.3.1	Regulierung der CPK23-Aktivität durch Phosphorylierung des Pseudosubstratsegments.....	109
4.2	CPK21 und CPK23 als Regulatoren der abiotischen Stress-Signaltransduktion	110
4.2.1	Funktionalität eines Resttranskripts in den Linien <i>cpk21-1</i> und <i>cpk23-1</i>	110
4.2.2	<i>cpk21-1</i> zeigt eine erhöhte Toleranz gegenüber osmotischem Stress.....	111
4.2.3	<i>cpk21-1</i> und <i>cpk23-1</i> zeigen eine erhöhte Expression ABA- und abiotischer Stress-abhängiger Markergene.....	113
4.2.4	CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion	116
4.2.4.1	CPK21 und CPK23 als negative Regulatoren in der ABA- und RCAR1-abhängigen <i>RD29B</i> -Expression	116
4.2.5	Teilweise überschneidende Funktionen der CPK21 und CPK23	118
4.2.6	Interaktions- und regulatorische Analyse mit anderen Komponenten der ABA-Signaltransduktion	119
4.2.6.1	PP2Cs als Interaktoren der CPK21 und CPK23	119
4.2.6.2	Anionenkanäle als <i>in vivo</i> Substrate der CPK21 und CPK23	120
4.2.6.3	Unterschiedliche Funktionen der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion in unterschiedlichen Zelltypen	122
5	Zusammenfassung / Summary	124
5.1	Zusammenfassung	124
5.2	Summary	125
6	Quellen	127
7	Anhang	XVII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1: Verschiedene auf Pflanze wirkende Stressfaktoren und die Signalverarbeitung.	1
Abbildung 1–2: Schema der CDPK-Domänenstruktur.....	2
Abbildung 1–3: Gruppierung der 34 <i>A. thaliana</i> -CDPKs aufgrund der Sequenzhomologie. ...	3
Abbildung 1–4: Genomische Verteilung der CDPK-Gene auf den <i>A. thaliana</i> -Chromosomen.	4
Abbildung 1–5: Das EF-Hand-Ca ²⁺ -Bindemotiv.	5
Abbildung 1–6: Die CDPK-Struktur in der aktiven und inaktiven Konformation.	9
Abbildung 1–7: Biologisch vorkommendes S-ABA.....	13
Abbildung 1–8: Schematische Darstellung der ABA-Signaltransduktion.	15
Abbildung 1–9: Biophysik der Spaltöffnungsbewegung.	19
Abbildung 3–1: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie SALK_029412 <i>cpk21-1</i>	62
Abbildung 3–2: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie SALK_007958 <i>cpk23-1</i>	63
Abbildung 3–3: Untersuchung des <i>CPK23</i> -Transkripts in der <i>cpk23-1</i> -Mutante.....	64
Abbildung 3–4: Phänotypische Untersuchung der osmotischen Stresstoleranz.	66
Abbildung 3–5: Die Expressionsanalyse der Markergene <i>RD29A</i> , <i>COR15A</i> , <i>DREB1A</i> und <i>CPK23</i> sowie <i>CPK21</i> unter Kontrollbedingungen.	68
Abbildung 3–6: Die Expressionsanalyse der Markergene <i>RD29A</i> , <i>COR15A</i> , <i>DREB1A</i> und <i>CPK23</i> sowie <i>CPK21</i>	69
Abbildung 3–7: Die Expressionsanalyse des Markergens <i>RD29B</i>	70
Abbildung 3–8: Untersuchung der RCAR1-abhängigen <i>RD29B</i> -Expression in den Linien <i>cpk21-1</i> und <i>cpk23-1</i>	71
Abbildung 3–9: Untersuchung des Einflusses der CPK23 auf die RCAR1-abhängige <i>RD29B</i> -Expression.	72
Abbildung 3–10: Analyse der regulatorischen Funktion der CPK23 auf die ABA-induzierte RCAR1-abhängige <i>RD29B</i> -Expression.	73
Abbildung 3–11: Untersuchung des Einflusses der CPK21 auf die RCAR1-abhängige <i>RD29B</i> -Expression.	74
Abbildung 3–12: Untersuchung des Einflusses der konstitutiv aktiven CPK21vk und einer inaktiven Variante CPK21vkD204A auf die RCAR1-abhängige <i>RD29B</i> -Expression.....	75
Abbildung 3–13: Interaktionsanalysen einer zur CPK23 homologen CDPK aus <i>Landsberg erecta</i> (LerCDPK) und ColCPK21 mit ABI2 <i>in vivo</i>	77
Abbildung 3–14: Interaktionsstudien der CPK23 und OST1 mit NT-SLAC1 und CT-SLAC1 <i>in vivo</i>	78
Abbildung 3–15: Analyse der ABA- und CPK21-abhängigen NT-SLAH3-Phosphorylierung.	80
Abbildung 3–16: Die Ca ²⁺ -abhängige Kinaseaktivität der CPK21 und CPK23.	81
Abbildung 3–17: Sequenzvergleich der CPK21- und CPK23-CLD unter Verwendung	

ClustelW2.....	83
Abbildung 3–18: Sequencevergleich des CDPK Pseudosubstratsegments.	85
Abbildung 3–19: In den biochemischen Untersuchungen verwendete Konstrukte.	88
Abbildung 3–20: Untersuchung der Ca ²⁺ -abhängigen Kinaseaktivität der CPK23 und CPK23-Varianten mit veränderter Ca ²⁺ -abhängiger Kinaseaktivität mit NT-SLAC1 als Substrat.....	89
Abbildung 3–21: Analyse der Ca ²⁺ -abhängigen Kinaseaktivität der CPK23 und CPK21 im Vergleich sowie CPK23-Varianten mit veränderter Ca ²⁺ -abhängiger Kinaseaktivität und SLAC1.1 als Substrat.	90
Abbildung 3–22: Der Einfluss von Ca ²⁺ auf das Laufverhalten im SDS-Gel.....	92
Abbildung 3–23: Der Einfluss von Ca ²⁺ auf das Laufverhalten im SDS-Gel der CPK21, CPK23, CPK23:21-CLD und CPK23-Q393E.	93
Abbildung 3–24: Analyse der Autophosphorylierung verschiedener CPK23-Varianten.....	94
Abbildung 3–25: In den biochemischen Untersuchungen verwendete EF-Hand-Mutanten mit degenerierten EF-Hand-Motiven.	95
Abbildung 3–26: Untersuchung des Einflusses der einzelnen EF-Hände auf die Kinaseaktivität.	96
Abbildung 3–27: Interaktionstest der CLD mit der CH1_2-Helix der CPK21 mit der SPR-Technologie unter Verwendung eines „Biacore 3000“.	98
Abbildung 4–1: Regulierung der untersuchten abiotischen Stress-Markergene.	115
Abbildung 4–2: Schematische Darstellung der zur SLAH3- und SLAC1-Aktivierung führenden ABA-Signaltransduktionswege in den Stomata.....	121

Anmerkung: Bereits veröffentlichte Ergebnisse dieser Arbeit Daten aus Abbildung 3-1, 3-4 und 3-6 (Franz et al. 2011), Abbildung 3-14 (Geiger et al. 2010) und Abbildung 3-15 (Geiger et al. 2011).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1–1: Zusammensetzung der EF-Hand-Schleife.....	6
Tabelle 1–2: Untersuchungen von CDPKs in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort mit stabilen Überexpressionslinien und T-DNA-Insertionslinien.....	21
Tabelle 1–3: Übersicht der diskutierten CDPK-Interaktoren und <i>in vivo</i> Substrate.....	24
Tabelle 1–4: Auswahl der Untersuchungen zur transkriptionellen Regulierung von CDPK-mRNA nach abiotischer Stress- und ABA-Behandlung.....	26
Tabelle 2–1: Verwendete Enzyme, Proteine, Antikörper und Größenstandards.....	28
Tabelle 2–2: Verwendete Medien.....	29
Tabelle 2–3: Verwendete <i>E.coli</i> -Stämme.....	30
Tabelle 2–4: Verwendete Pflanzenlinien.....	30
Tabelle 2–5: Verwendete Vektoren.....	31
Tabelle 2–6: Plasmide zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	32
Tabelle 2–7: Plasmide für Untersuchungen in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten.....	34
Tabelle 2–8: PCR-Programm.....	40
Tabelle 2–9: Klonierungen in pXCS Vektoren.....	41
Tabelle 2-10: Klonierung in pET30a.....	42
Tabelle 2–11: Klonierung der CPK23-Mutanten in pGEX-6P1 5V/His.....	43
Tabelle 2–12: Mutagenese-PCR-Programm.....	45
Tabelle 2–13: Schema der Aufreinigung für SPR-Interaktionsanalysen.....	48
Tabelle 2–14: DNA-Mengenverteilung bei Kotransfektion unterschiedlicher Konstrukte pro Transfektionsansatz.....	52
Tabelle 2–15: Übersicht über die Arbeitsschritte der Immunodetektion.....	56

Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

µl	Mikroliter
µM	Mikrometer
35S-Promoters; p35S	Blumenkohl-Mosaik-Virus- Promoters
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ackerschmalwand
ABA	Abscisinsäure
ABF	„ABRE-binding Factors“
ABI1	„ABA insensitive 1“
ABI2	„ABA insensitive 2“
ABRE	„Abscisic Acid Responsive Element“
AHG1	„ABA-Hypersensitive Germination 1“
AHG2	„ABA-Hypersensitive Germination 3“
AP	Alkaline-Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AREB	„Abscisic Acid Responsive Elements-Binding Factor“
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ackerschmalwand
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	Tetrazolium-5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl Phosphat
BiFC	„ Bifluorescence Complementation Assay“, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin
C	Celsius
Ca ²⁺	doppelt geladenes Kalziumion
ca.	circa
CaMK	calmodulinabhängige Kinase
CBL	Calcineurin B-ähnlich („-like“)
CDPK/CPK	Ca ²⁺ -abhängige („-dependent“) Proteinkinase
CDS	codierende Sequenz
CIPK	CBL-interagierende Proteinkinase
cis-Element	regulatorische DNA-Sequenzen (cis= diesseits)
CLD	calmodulinähnliche („-like“) Domäne
Co-IP	Coimmunopräzipitationen
Col-0	Columbia (<i>A. thaliana</i> Ökotyp)
COR15A	„ Cold-Regulated 15A“

<i>Cp</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus, CT	Carboxy-Terminus
DACTAA	trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure Monohydrat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DRE	„Drought-Responsive Element“
DREB1A	„Dehydration Response Element Binding-Protein 1A“
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Erichia coli</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl-carbodiimide)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	und andere
fw	„forward“
g	Gramm
GFP	„Green Fluorescent Protein“
Gn	„Groundnut“ Erdnuss
GST	Gluthation-S-Tranferase
GUS	β-Glucuronidas
HA	Hämagglutinin
HAB1	„Homology to ABA Insensitive 1“
HAB2	„Homology to ABA Insensitive 2“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatografie
HRP	Meerrettichperoxidase
ICE1	„Inducer of CBF Expression 1“
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
IUPAC	„International Union of Pure and Applied Chemistry“
K ⁺	geladenes Kaliumion
KAT1	„K ⁺ -Channel in <i>A. thaliana</i> 1“
Kd	Dissoziationskonstante
KDa	Kilodalton

LB	„Left Border“
<i>Le</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Tomate
LEA	„Late Embryogenesis Abundant“
Ler	Landsberg erecta <i>A. thaliana</i> , Ökotyp
LUC	Luciferase
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
Mg ²⁺	doppelt geladenes Magnesiumion
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMLV	reverse Transkriptase M170
MPa	Megapascal
mRNA	„messenger“ RNA
MS	„Murashige-Skoog“
MUG	„4-Methylumbelliferyl-Glucuronid“
Na ⁺	geladenes Natriumion
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-hydroxysuccinimide
Ni ²⁺	doppelt geladenes Nickelion
nm	Nanometer
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , Tabak
N-terminale	Amino-terminal
N-Terminus, NT	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Os	<i>Oryza sativa</i> , Reis
OST1	„Open Stomata 1“
<i>P. tremula</i>	<i>Populus tremula</i> , Aspen
PAT	Phosphinothricin-Acetyltransferase
<i>pCPK21</i>	Promoter der <i>CPK21</i>
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PP2C	Protein Phosphatase 2C
<i>pRD29B</i>	Promoter von <i>RD29B</i>
PYL	„Pyrabactin Resistance Like“

PYR	„Pyrabactin Resistance“ „
RAP	„Rapid-Alkaline-Phosphatase“
RB	„Right Border“
RbohF	„Respiratory burst oxidase homolog F“
RCAR1	„Regulatory Components of ABA Receptor“
RD29A	„Responsive to Dessication 29A“
RD29B	„Responsive to Dessication 29B“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	„rounds per minut“, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	„Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“
RU	„Response unit“ Bindesignal
rer	„reverse“
s	Sekunde
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> , Tomate
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SLAC1	„Slow Anion Channel-Associated 1“
SLAH3	„SLAC1 Homologes 3“
SnRK2	„SNF1-related protein kinase 2“
SPR	„Surface Plasma Resonance“
<i>tac</i> -Promoters	Synthetischer Promoter aus dem Tryptophan-Operon und Lactose-Operon
TAIR	Arabidopsis Information Resource
T-DNA	transferierte DNA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tg	<i>Toxoplasma gondi</i>
TRIS	Trishydroxylmethylaminomethan
U	Unit
Ubi	Ubiquitin
USER	„Uraclil spezifisch Excision Reagent“
UTR	untranslatierte Bereich
v	Volumen
V	Volt
vk	Variable und Kinasedomäne, konstitutiv aktive CDPK-Variante
w	„Weight“, Gewicht
Wb	„Winged bean“ Goabohne

WT	Wildtyp
YFP	„Yellow Fluorescent Protein“
z. B.	zum Beispiel
μCi	Microcurie
ψ_p	Turgordruck
ψ_s	das osmotische Potenzial
ψ_w	Wasserpotential

Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

Aminosäure	3-Dreibuchstabenkode	1-Buchstabenkode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure/ Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure/ Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histiden	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Abkürzungsverzeichnis Nucleobasen der DNA

Nucleobase	Abkürzung
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T

1 Einleitung

1.1 Pflanzensignaltransduktion: Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff

Pflanzen sind sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Als sessile Organismen haben Pflanzen Anpassungsmechanismen entwickelt, die das Überleben auch in Trocken- oder Kälteperioden gewährleisten. Ein entscheidender Schritt z. B. bei Salzstress, Wassermangel und Pathogenbefall ist die Dekodierung von Umweltsignalen und die Weiterleitung dieser in Signaltransduktionswege.

Daraufhin kann eine geeignete adaptive Antwort erfolgen.

Ein wichtiges Signalmolekül bzw. einen sekundären Botenstoff stellt

das doppelt geladene Kalziumion (Ca^{2+}) dar. Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (100-200 nM basales Ca^{2+} -Niveau) konnte nach abiotischem Stress wie z. B. Kälte-, Salz- und Trockenstress, biotischem Stress und bei der Pflanzenhormonsignaltransduktion beobachtet werden (Knight 1999; Sanders et al. 1999; Kudla et al. 2010). Untersuchungen haben gezeigt, dass ein bestimmter Stimulus zu einer spezifischen Ausprägung des Ca^{2+} -Signals führt (McAinsh und Hetherington 1998; Kudla et al. 2010). Das Ca^{2+} -Signal kann in Form eines einfachen Anstieges oder als oszillierende Schwingung auftreten. Es wird vermutet, dass die Größe der Amplitude des Ca^{2+} -Signals, die Frequenz, die Länge der Oszillation und die räumliche Verteilung einen Einfluss auf die Signalweiterleitung haben. Interessanterweise konnte für die abiotischen Stressstimuli Kälte und Salz ein Zusammenhang zwischen der Größe der Ca^{2+} -Konzentrationsänderung und der Stärke des Stresssignals, z. B. der Temperaturdifferenz, beobachtet werden (Plieth et al. 1999; Tracy et al. 2008). Einen Einfluss auf die Signalweiterleitung hat auch die gewebespezifische oder im Zellkompartiment vorhandene Zusammensetzung von Ca^{2+} -Sensor-Proteinen. Ca^{2+} -Sensor-Proteine können das Ca^{2+} -Signal in Protein-Protein-Interaktionen, bestimmte Phosphorylierungskaskaden oder eine Änderung im Bereich der Transkription übersetzen (Sanders et al. 2002; Kudla et al. 2010). In Pflanzen wird die zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationsänderung durch drei Kinase-Proteinfamilien in Phosphorylierungssignale übersetzt. Im Einzelnen sind dies

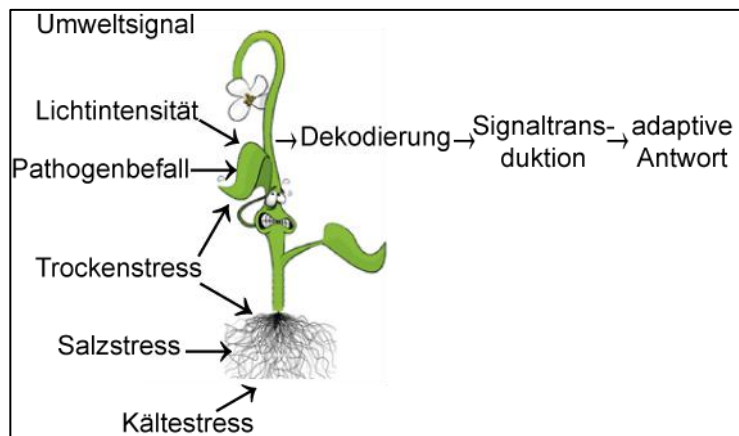


Abbildung 1-1: Verschiedene auf Pflanze wirkende Stressfaktoren und die Signalverarbeitung. Die Pflanze übernommen aus (Flintoft 2008)

- die **cal**modulinabhängige **K**inase (CaMK), die durch die Interaktion mit dem Ca^{2+} -Sensor-Protein Calmodulin aktiviert wird,
- die **CBL**-interagierende **P**roteink**i**nase (CIPK), die durch die Bindung des Ca^{2+} -Sensor-Proteins **C**alcineurin **B**-ähnlich („-like“) (CBL) aktiviert wird, und
- die Ca^{2+} -abhängige („-dependent“) **P**roteink**i**nase (CDPK) (Batistic und Kudla 2004; Harper et al. 2004).

1.2 Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase CDPK

Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPKs) kommen in Pflanzen und Protozoen vor (Harmon et al. 2000). CDPKs enthalten einen Ca^{2+} -Sensor, die calmodulinähnliche Domäne, und einen Effektor, die Kinasedomäne, in einem Molekül. Eine viel diskutierte Hypothese ist die Entstehung von CDPKs durch eine Fusion einer CaMK mit einem Calmodulin (Harmon et al. 2000; Cheng et al. 2002). CDPKs besitzen eine N-terminale variable Domäne, eine Kinasedomäne, ein Pseudosubstratsegment, auch als „junction“ bezeichnet, und eine calmodulinähnliche („-like“) **D**omäne (CLD) (Abbildung 1-2).

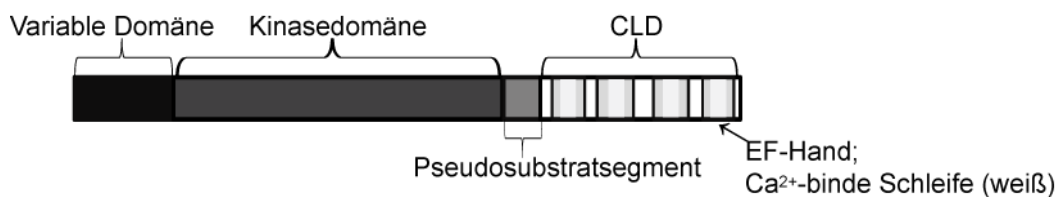


Abbildung 1–2: Schema der CDPK-Domänenstruktur.

1.2.1 CDPK-Proteinfamilie in *A. thaliana*

In *Arabidopsis thaliana* konnten 34 für CDPK, auch CPKs, kodierende Gene identifiziert werden (Cheng et al. 2002). Beim Aminosäuren-Sequenzvergleich der 34 *A. thaliana*-CDPKs fällt eine hohe Konserviertheit für die Kinasedomäne (44-95 % Identität und 60-98 % Homologie), das Pseudosubstratsegment (23-100 % Identität und 42-100 % Homologie) und die calmodulinähnliche Domäne (27-97 % Identität und 50-98 % Homologie) auf (Cheng et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigt die N-terminale variable Domäne eine große Variabilität über die 34 Isoformen. Die 34 CDPKs lassen sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Untergruppen unterteilen (Abbildung 1-3). Diese Unterteilung in vier Untergruppen ergab sich auch bei alleiniger Betrachtung der Sequenzhomologie der N-terminalen variablen Domäne.

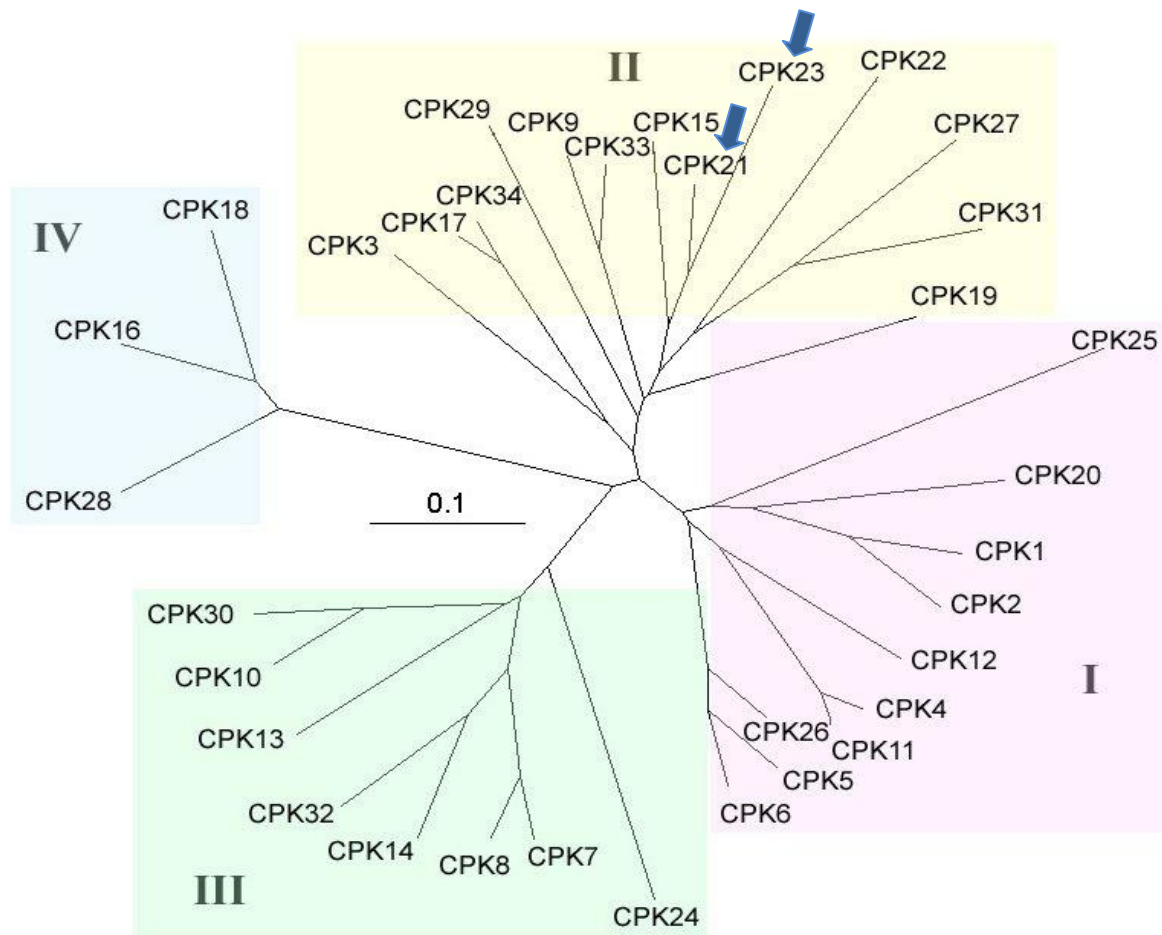


Abbildung 1–3: Gruppierung der 34 *A. thaliana*-CDPKs aufgrund der Sequenzhomologie. Die *A. thaliana*-CDPK-Proteinfamilie bildet vier Untergruppen nach Cheng et al. (2002). Die Astlänge ist proportional zur Sequenzdifferenz der CDPKs. Die in dieser Arbeit untersuchten CDPKs sind CPK21 und CPK23 in der Gruppe II (Pfeile), die auf Proteinebene eine Sequenzidentität von 81 % aufweisen.

Die 34 CDPKs in *A. thaliana* verteilen sich über alle fünf Chromosomen. In Abbildung 1-4 ist die genomische Lokalisation dargestellt.

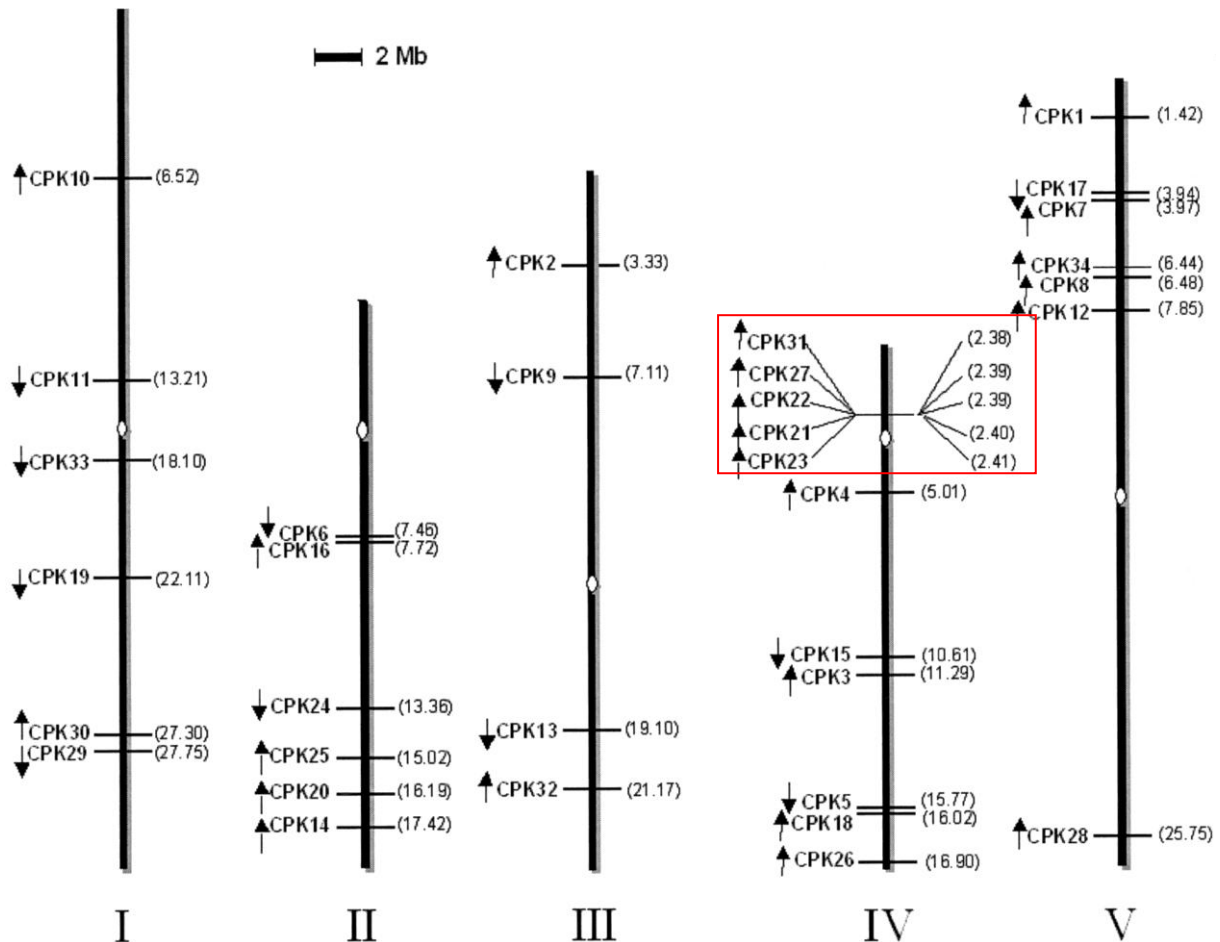


Abbildung 1–4: Genomische Verteilung der CDPK-Gene auf den *A. thaliana*-Chromosomen. Die weißen Ovale geben die Lage der Zentromere an, die Pfeile neben den Genen die Transkriptionsrichtung, die Nummer neben den CDPKs die entsprechende Lage des ersten Exons in Megabasen. Das rote Rechteck markiert einen fünf CDPKs umfassenden Gencluster. Abbildung nach Cheng et al. (2002).

Auffällig ist ein Gencluster auf Chromosom IV, das die in dieser Arbeit untersuchten CDPKs CPK21 und CPK23 enthält. Der Aminosäure-Sequenzvergleich zeigt ein hohes Maß an Konserviertheit zwischen diesen fünf im Gencluster vorhandenen CDPKs. Bei der Betrachtung der gesamten Proteinsequenz ergeben sich eine Identität von 61-82 % und eine Homologie von 74-89 %, sogar die N-terminale variable Domäne weist eine Identität von 21-78 % und eine Homologie von 22-85 % auf (Cheng et al., 2002). Die große Homologie deutet auf eine evolutionär späte Aufspaltung dieser fünf Gene durch Genduplikation hin (Cheng et al. 2002).

1.2.2 Biochemische Aktivierung von CDPKs

1.2.2.1 Die EF-Hand, ein Ca^{2+} -Bindemotiv

Die Ca^{2+} -Bindung in CDPKs erfolgt über ein EF-Hand- Ca^{2+} -Bindemotiv, dargestellt in Abbildung 1-5. Die EF-Hand besteht aus einer Helix-Schleife-Helix-Struktur, genauer aus zwei α -Helices beidseitig einer Ca^{2+} -chelatierenden Schleife (Gifford et al. 2007). Die N-

terminale Helix wird als E- und die C-terminale Helix als F-Helix bezeichnet, entsprechend der bei der Parvalbumin-Kristallstruktur benutzten Nomenklatur (Kretsinger und Nockolds 1973). Die Komplexbildung von Ca^{2+} erfolgt über negative Ladungen, weswegen die Ca^{2+} -Bindeschleife reich an Aminosäuren mit negativ geladenen Aminosäure-Seitenketten wie Asparagin- oder Glutaminsäure ist (Gifford et al. 2007). Die Bindung erfolgt über sieben negative Ladungen. Die Ca^{2+} -chelatierende Schleife umfasst neun Aminosäuren, von denen fünf an der Bindung direkt beteiligt sind. Die zwei weiteren Bindungen kommen von einer sauren Seitenkette auf Position 3 der F-Helix. Neben den neun Aminosäuren der Schleife werden die ersten drei der F-Helix, einschließlich der sauren Aminosäure auf Position 3 der F-Helix, als die zwölf Aminosäuren der Ca^{2+} -Bindeschleife zusammengefasst. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wird diese Nomenklatur mit numerischer Bezeichnung von 1-12 verwendet. Die Aminosäuren an den Positionen 1 und 3 sind durch ein Sauerstoffatom der Seitenkette, meist einer Carboxygruppe, an der Ca^{2+} -Bindung direkt beteiligt. Position 12 ist durch beide Sauerstoffatome der Carboxygruppe an der Bindung beteiligt. An Position 7 erfolgt die Ca^{2+} -Bindung durch eine Carbonylgruppe des Polypeptid-Rückgrats und an Position 9 meist durch ein Wassermolekül, das über eine Wasserstoffbrücke an die Aminosäure gebunden ist (Gifford et al. 2007). Die in der EF-Hand-Schleife vorkommenden Aminosäuren, ihre Häufigkeiten und das EF-Hand-Konsensusmotiv sind in Tabelle 1-1 angegeben.

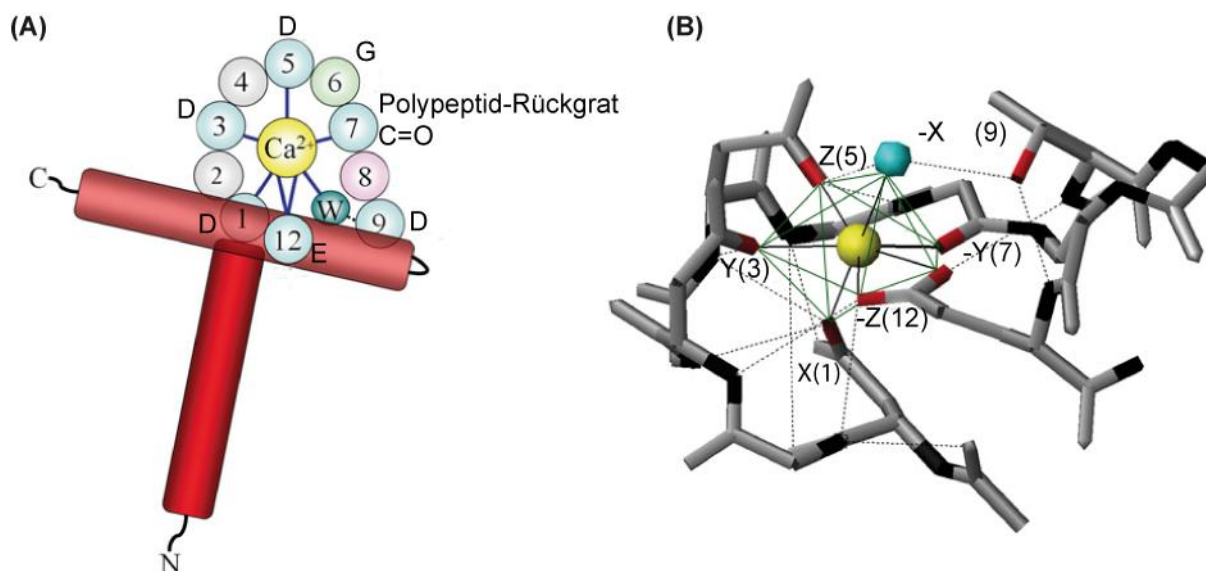


Abbildung 1-5: Das EF-Hand- Ca^{2+} -Bindemotiv.

Abbildung verändert nach Gifford et al. (2007). (A) – Schematische Darstellung der Ca^{2+} -Bindeschleife. Die E- (N-terminale) und F- (C-terminale) Helix sind rot dargestellt. Die zwölf Aminosäuren der Ca^{2+} -Bindeschleife sind mit Nummerierung abgebildet, blau die an der Ca^{2+} -Bindung beteiligten Aminosäuren. Die Ca^{2+} -Bindungen werden durch blaue Linien angedeutet. Türkis abgebildet ist das an der Ca^{2+} -Bindung beteiligte Wassermolekül. Das für den „Knick“ in der Bindeschleife wichtige Glyzin ist grün dargestellt. Das chelatierte Ca^{2+} ist gelb markiert. (B) – Räumlich pentagonale, bipyramidale Koordination der Ca^{2+} -Chelation. Schwarze Linien deuten die Bindungen und grüne die dadurch entstehende bipyramidale Koordination an. Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren der Schleife dar. Die Polypeptid-

Rückgrat-Aminogruppe ist schwarz, das Seitenketten-Sauerstoffatom rot (auf Position -Y ist das Polypeptid-Rückgrat Sauerstoff rot), Wasser türkis und Ca^{2+} gelb dargestellt.

Die bevorzugte räumliche Anordnung der Liganden bei der Ca^{2+} -Bindung ist die Anordnung von sieben Liganden in einer pentagonalen Bipyramide (Gifford et al. 2007; Nara und Tanokura 2008). In der EF-Hand sind nur sechs Aminosäuren an der Bindung beteiligt, wobei Position 12 zwei Liganden zur Verfügung stellt (Gifford et al. 2007). Dadurch kann die Bindung von Ca^{2+} in einer EF-Hand räumlich in einer pentagonalen, bipyramidalen Koordination erfolgen. Die sechs Aminosäuren, die an der Ca^{2+} -Chelation direkt beteiligt sind, können auch nach ihrer räumlichen Anordnung in einem x-y-z-Achsen-Schema bezeichnet werden. Eine schematische Übersicht über eine EF-Hand mit gebundenem Ca^{2+} ist in Abbildung 1-5 (A), ein Schema der räumlichen Anordnung der Ca^{2+} -Bindeschleife in der pentagonalen, bipyramidalen Koordination in Abbildung 1-5 (B) dargestellt.

Tabelle 1–1: Zusammensetzung der EF-Hand-Schleife.

Tabelle verändert nach Gifford et al. (2007). Die für jede Position am häufigsten vorkommende Aminosäure ist mit der entsprechenden prozentualen Häufigkeit angegeben. Des Weiteren sind alle Aminosäuren angegeben, die mit einer Häufigkeit von $> 5\%$ auftreten. Die Ca^{2+} -Bindeschleife ist (leicht verändert) nach der Konsensussequenz aufgeführt (PROSITE-Dokumentation PS00018) (Sigrist et al. 2010). Erklärung der Konsensussequenzdarstellung: {} = alle Aminosäuren außer den aufgelisteten, [] = alle aufgelisteten Aminosäuren, x = alle Aminosäuren

Position in der EF-Schleife	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konsensussequenz	D	{W}	[DNS]	{[LVF YW}	[DEN STG]	[DNQ GHR K]	{GP}	[LIV MC]	[DEN QST AGC]	x	x	[DE]
Häufigste Aminosäure	D 100%	K 29%	D 76%	G 56%	D 52%	G 96%	T 23%	I 68%	D 32%	F 23%	E 29%	E 92%
Aminosäuren mit einer Häufigkeit $>5\%$		A Q T V I S E R	N	K R N	S N		F K Q T E R	V L	S T E N G Q	Y A T L E K	D K A P N	D

1.2.2.1.1 Das EF-Hand-Paar

Das EF-Hand-Motiv tritt paarweise auf (Grabarek 2006; Gifford et al. 2007). In der Ca^{2+} -gebundenen Form bildet sich ein Bündel aus vier Helices (Gifford et al. 2007). Die amphipathischen α -Helices lagern sich zusammen, und eine hydrophobe Spalte entsteht. Die strukturelle Anordnung der EF-Hand-Paare wird durch ein sich zwischen den Ca^{2+} -Bindeschleifen ausbildendes, kurzes, antiparalleles β -Faltblatt stabilisiert. Dieses β -Faltblatt kommt durch Wasserstoffbrückenbindungen des Polypeptid-Rückgrats der Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren 7,8 und 8,9 zustande (Grabarek 2006). Des Weiteren

stabilisieren zahlreiche hydrophobe Kontakte zwischen den Helices die EF-Hand-Interaktion. CDPKs besitzen vier EF-Hand-Motive. Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass in CDPKs die beiden N-terminalen und C-terminalen EF-Hände paarweise zusammenarbeiten (Zhao et al. 1994; Weljie et al. 2000; Rutschmann et al. 2002; Christodoulou et al. 2004; Wernimont et al. 2011). In Untersuchungen konnten für CDPKs aus Sojabohne, *A. thaliana*, Tomate und *Plasmodium falciparum* zwei Gruppen kooperativer Ca^{2+} -bindender EF-Hand-Paare identifiziert werden (Zhao et al. 1994; Weljie et al. 2000; Rutschmann et al. 2002; Christodoulou et al. 2004). Genauer spalten sich die vier EF-Hände in ein stark (C-terminal) und ein schwach (N-terminal) Ca^{2+} -affines EF-Hand-Paar auf. Die Ca^{2+} -Affinitäten deuten auf eine mögliche Ca^{2+} -Bindung bereits bei einem basalen Ca^{2+} -Niveau an die C-terminalen EF-Hände hin, wohingegen zur Bindung an die N-terminalen EF-Hände ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration benötigt wird. Bei *in vitro* Kinaseaktivitätsmessungen konnten Unterschiede in der Funktion der EF-Hand-Paare beobachtet werden. So zeigte sich eine wichtigere Funktion der N-terminalen EF-Hände (Zhao et al. 1994; Franz et al. 2011).

1.2.2.1.2 Ca^{2+} -Selektivität bei der EF-Hand

Ca^{2+} wird von vielen EF-Hand-Motiven selektiv gebunden, trotz einer bis zu 10^5 -fach höheren zellulären Konzentration anderer Kationen wie Mg^{2+} , Na^+ und K^+ (Falke et al. 1991). Aufgrund der vielen negativen Ladungen im EF-Hand-Motiv wird ein bivalentes Kation benötigt, damit die abstoßende Kraft der negativen Ladungen stabilisiert werden kann (Falke et al. 1991; Gifford et al. 2007). Dieses Modell der elektrostatischen Abstoßung nach Falke geht auch davon aus, dass Ca^{2+} aufgrund seines größeren Ionenradius eher stabilisierend wirken kann als Mg^{2+} und daher mit Präferenz gebunden wird. Aufgrund des kleineren Ionenradius spielen bei einer Mg^{2+} -EF-Hand-Bindung die energetisch ungünstigeren Wasserstoffbrücken eine größere Rolle (Gifford et al. 2007). Dennoch stellt die hohe Konzentration von freiem Mg^{2+} (0,5-2,0 mM) in den Zellen ein Problem für die Ca^{2+} -Selektivität der EF-Hände dar. Zwei Eigenschaften ermöglichen es, zwischen Ca^{2+} und Mg^{2+} zu unterscheiden: (i) Mg^{2+} benötigt sechs Liganden in einer octahedralen Geometrie; (ii) Mg^{2+} hat einen kleineren Ionenradius. Für viele EF-Hände konnte eine Mg^{2+} -Bindung bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen gezeigt werden (Gifford et al. 2007). Diese Bindung erfolgt nur mit den Liganden 1, 3, 5, 7 und in einigen Fällen 9; die für die Ca^{2+} -Bindung wichtige Position 12 ist an der Bindung nicht beteiligt (Gifford et al. 2007; Nara und Tanokura 2008). Die fehlenden Bindungen erfolgen durch Wassermoleküle. Konformationsstudien und Aktivitätsmessungen deuten darauf hin, dass die Mg^{2+} -Bindung häufig nicht zur Einnahme der aktiven EF-Hand-Konformation führt (Gifford et al. 2007; Nara und Tanokura 2008). Für die aktive Konformation scheint die Beteiligung der Position 12 an der Bindung entscheidend zu sein. Eine zweite Klasse von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -bindenden EF-Händen konnte identifiziert werden, die Mg^{2+} mit einer höheren Affinität als die oben beschriebenen binden (Gifford et al. 2007). Des Weiteren binden sie

Mg²⁺ in einer ähnlichen Konformation wie Ca²⁺. Dabei ist Position 12 durch ein Sauerstoffatom an der Bindung beteiligt. Bei dieser EF-Hand-Mg²⁺-Bindung nimmt die EF-Hand eine aktive Konformation ähnlich einer Ca²⁺-Bindung an. Die Flexibilität der Position 12 ist für diese Bindung entscheidend. In Ca²⁺-spezifischen EF-Händen kann Position 12 nur die Konformation für zwei Sauerstoffionenbindungen einnehmen (Gifford et al. 2007).

1.2.2.2 Ca²⁺-abhängige Konformationsänderung von CDPKs

2010 konnten zwei Gruppen in Röntgenstrukturanalysen von gereinigten und isolierten CDPKs aus *Cryptosporidium parvum* (CpCDPK1) und *Toxoplasma gondii* (TgCDPK1, TgCDPK3) die Ca²⁺-gebundenen aktiven und die freien inaktiven Konformation zeigen (Ojo et al. 2010; Wernimont et al. 2010). Dies ermöglichte neue Einsichten in die Aktivierung und Konformationsänderung beim Übergang von der inaktiven zur aktiven Konformation (Abbildung 1-6).

In der inaktiven Form bildet sich eine α -Helix aus, die aus dem Pseudosubstratsegment und der E-Helix der EF-Hand 1 besteht (Wernimont et al. 2010). Diese lange α -Helix wird als CH1 bezeichnet (Abbildung 1-6). Das Pseudosubstratsegment kann in zwei Teile unterteilt werden. Der erste Teil, auch CH1_1 genannt, stellt die Autoinhibitorregion dar, die in der inaktiven Konformation das aktive Zentrum der Kinasedomäne blockiert. Die Autoinhibitorregion umfasst auch die ersten Aminosäuren des zweiten Teils, auch CH1_2 genannt. In der inaktiven Kinase interagiert eine basische Aminosäure der Autoinhibitorregion von CH1_2 mit sauren Aminosäuren der Kinasedomäne, wodurch eine für die ATP-Bindung essenzielle Glutaminsäure räumlich von der ATP-Bindestelle ferngehalten wird. Des Weiteren ist CH1_2 reich an hydrophoben Aminosäuren, was für die Interaktion mit der CLD von Bedeutung ist. Die CLD mit dem Pseudosubstratsegment, auch als Aktivierungsdomäne bezeichnet, ähnelt in der geschlossenen Konformation einer Hantel mit einer Verlängerung durch die CH1_1-Helix (Abbildung 1-6) (Wernimont et al. 2010). Parallel zu CH1 befindet sich eine zweite, kürzere α -Helix (CH2) (Abbildung 1-6). CH2 setzt sich aus der F-Helix der zweiten EF-Hand und der E-Helix der dritten EF-Hand sowie einer kurzen, verbindenden Helix („linker“) zusammen.

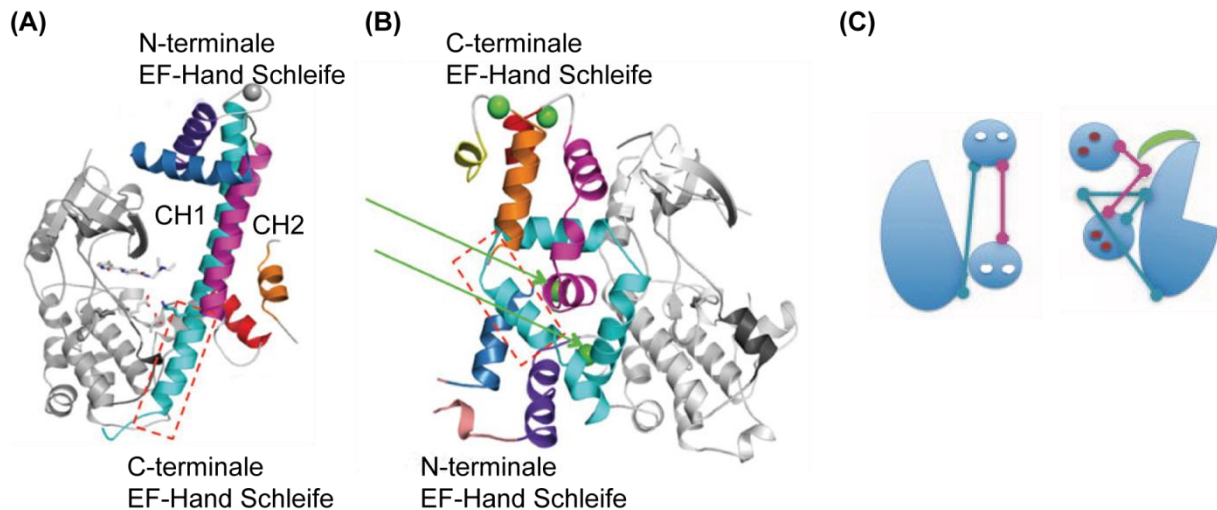


Abbildung 1–6: Die CDPK-Struktur in der aktiven und inaktiven Konformation.

Abbildung (A) und (B) nach Wernimont et al. (2010) und (C) nach Wernimont et al. (2011). In (A) und (B) ist die Kinasedomäne grau und die Aktivierungsdomäne (Pseudosubstratsegment und CLD) farbig dargestellt. Die Helices CH1 und CH2 sind türkis und pink dargestellt. Ein rotes Rechteck markiert die Autoinhibitorregion (CH1_1). (A) – Darstellung der inaktiven Konformation von *TgCDPK3* (*Toxoplasma gondii*). In einer N-terminalen EF-Hand konnte ein gebundenes Mg^{2+} nachgewiesen werden, grau eingezeichnet. (B) – Die Struktur der aktiven *CpCDPK1* (*Cryptosporidium parvum*) mit vier gebundenen Ca^{2+} -Ionen. Ca^{2+} ist durch grüne Kugeln dargestellt, durch die CDPK-Struktur verdeckte Ca^{2+} -Ionen sind durch grüne Pfeile hervorgehoben. (C) – Schematische Darstellung der inaktiven Konformation (links) und der aktiven Konformation (rechts). Die Kinasedomäne ist in der inaktiven Form als großer blauer Halbmond, in der aktiven Form als großes blaues G dargestellt. Zwei blaue Kreise stellen die N- und C-terminalen EF-Hand-Schleifen dar. Die Helices CH1 und CH2 sind türkis bzw. pink markiert. Ca^{2+} -Ionen sind als rote Kreise abgebildet.

Nach der Ca^{2+} -Bindung kommt es zur Änderung der Position der CLD zur Kinasedomäne. Die CLD verschiebt sich um ca. 135° im Uhrzeigersinn (Abbildung 1-6), was zum Freiwerden des aktiven Zentrums der Kinasedomäne führt (Wernimont et al. 2010). Aus der Ca^{2+} -Bindung resultiert eine Öffnung der Aktivierungsdomäne (der CLD und des Pseudosubstratsegments), die Freilegung hydrophober Oberflächen und eine neue Faltung der Aktivierungsdomäne (Abbildung 1-6). Die CH1-Helix bildet nach der Ca^{2+} -Bindung drei getrennte Helices, die CH1_1, CH1_2 und der E-Helix der EF-Hand 1 entsprechen. CH2 zerfällt nach der Ca^{2+} -Bindung in die F-Helix der EF-Hand 2 und die E-Helix der EF-Hand 3. Jede EF-Hand-Schleife enthält nach der Ca^{2+} -Bindung fünf Helices (Wernimont et al. 2011). Die N-terminale EF-Hand-Schleife enthält die Helices des entsprechenden EF-Hand-Paares und die CH1_1-Helix, die C-terminale Schleife die Helices der EF-Hand 3 und 4 sowie CH1_2. Für die *AtCPK1* konnte gezeigt werden, dass Teile von CH1_2 eine amphipathische α -Helix darstellen, die in der Ca^{2+} -gebundenen Form mit einer hydrophoben Spalte der C-terminalen EF-Hände interagiert (Christodoulou et al. 2004; Chandran et al. 2006). Wernimont et al. (2011) beschrieben die Bindung der CH1_2 an die CLD wie folgt: CH1_2 befindet sich im Griff der Handfläche der C-terminalen EF-Hand-Schleife und des Handrückens der N-terminalen EF-Hand-Schleife. Die N-terminale EF-Hand-Schleife sei im Vergleich zu Calmodulin um 180° gedreht, sodass die hydrophobe Oberfläche der N-

terminalen EF-Hand-Schleife nicht mit CH1_2 interagiere. Die hydrophobe Oberfläche der N-terminalen EF-Hand-Schleife lagere sich an CH1_1 an. Interessant scheint, dass die C-terminalen EF-Hände zwar mit CH1_2 interagieren, die Strukturdaten aber darauf hindeuten, dass diese Interaktion nur dann erfolgen kann, wenn die CH1-Helix in Form von drei Teilhelices vorliegt. Dieser Zerfall von CH1 zu CH1_1, CH1_2 und E-Helix der EF-Hand 1 setzt die Ca^{2+} -Bindung an die N-terminalen EF-Hände voraus.

1.2.2.3 Autophosphorylierungsabhängige CDPK-Aktivität

Die Fähigkeit, sich selbst an einem eigenen Serin oder Threonin zu phosphorylieren (Autophosphorylierung), konnte für viele CDPKs gezeigt werden. So wurde *in vitro* eine Ca^{2+} -abhängige Autophosphorylierung für viele CDPKs beschrieben, z. B. für *At*CPK21 sowie für eine CDPK aus Erdnuss *Gn*CDPK (*groundnut*) und Tomate *Le*CDPK1 (*Lycopersicon esculentum*) (Chaudhuri et al. 1999; Rutschmann et al. 2002; Franz et al. 2011). Eine Ca^{2+} -unabhängige Autophosphorylierungsaktivität konnte bei Goabohne *Wb*CDPK (*winged bean*) beobachtet werden (Saha und Singh 1995). Der Mechanismus einer (auto-) phosphorylierungsabhängigen Aktivierung von CDPKs wurde diskutiert, konnte aber noch nicht experimentell bestätigt werden (Bögge et al. 1988; Romeis et al. 2001). Bei Tabak konnte für die *Nt*CDPK2 (*Nicotiana tabacum*) eine Korrelation zwischen stressabhängiger *in vivo* Phosphorylierung und einer Zunahme der Kinaseaktivität beobachtet werden (Romeis et al. 2001). Für *Nt*CDPK2 konnten eine stressinduzierte *in vivo* Autophosphorylierungsstelle und eine Transphosphorylierungsstelle identifiziert werden (Witte et al. 2010). Dies deutet auf eine mögliche parallele Regulierung der Kinaseaktivität durch Auto- und Transphosphorylierung durch andere Kinasen hin. Einige *in vivo* Phosphorylierungsstellen von CDPKs wurden in massenspektrometrischen Analysen, entweder gezielt für CDPKs oder in Untersuchungen, welche das gesamte Pflanzenphosphoproteom betrachteten, identifiziert (Nühse et al. 2004; de la Fuente van Bentem et al. 2008; Witte et al. 2010). In einem massenspektrometrischen *in vitro* Ansatz mit rekombinanten Enzymen konnten Hegemann et al. (2006) in acht CDPKs Autophosphorylierungsstellen identifizieren. Autophosphorylierungsstellen waren in der N-terminalen variablen Domäne, der Kinasedomäne und der calmodulinähnlichen Domäne positioniert. Für CDPKs aus Pflanzen konnten im Pseudosubstratsegment bisher keine Autophosphorylierungsstellen identifiziert werden. In den Protisten-CDPKs von *Cryptosporidium parvum* *Cp*CDPK1, *Toxoplasma gondii* *Tg*CDPK1 und *Tg*CDPK3 wurden jedoch Autophosphorylierungsstellen im Pseudosubstratsegment nachgewiesen (Wernimont et al. 2011). Phosphorylierungsereignisse an den gefundenen Stellen des Pseudosubstratsegments würden die Oberflächeneigenschaften stark verändern. Durch diese Phosphorylierungsstellen könnte die Kinaseaktivität reguliert werden (Wernimont et al. 2011).

1.3 Abiotischer Stress

Als sessile Organismen haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, um mit den Herausforderungen durch Änderungen der Umweltbedingungen umzugehen. Es wird geschätzt, dass bei den meisten wichtigen Nutzpflanzen abiotischer Stress wie Trockenstress, Salzstress und extreme Temperaturen zu einem Ernteausfall von durchschnittlich bis zu 50 % führt (Qin et al. 2011). Das Verständnis dessen, wie Pflanzen mit Stress umgehen, ist notwendig für erfolgreiche genetische Ansätze zur Produktion von Pflanzen, die unter Bedingungen rauer Umwelt gut gedeihen, – ein wichtiges Ziel, da die Landwirtschaft die Folgen des Klimawandels spürt (Flintoft 2008).

1.3.1 Wassermangel als Teil des abiotischen Stresses mit Fokus auf osmotischem Stress

Ein unter vielen Bedingungen abiotischen Stresses auftretendes Problem ist der Wassermangel. Dieser Wassermangel kann Teil- oder Hauptursache des Effekts abiotischen Stresses auf die Pflanzen sein. Dieser tritt neben Trockenstress auch bei Zunahme des osmotischen Potentials der Umgebung auf, z. B. bei osmotischem Stress oder auch als Teil von Salzstress. Bei Frost führt die Bildung von Eiskristallen im extrazellulären Raum zum Austrocknen der Zellen. Die Reduktion des zur Verfügung stehenden Wassers kann als Reduktion des Wasserpotentials ψ_w dargestellt werden. Anpassungsprozesse der Pflanze können dazu führen, dass der Wasserverlust trotz des reduzierten ψ_w umgangen wird (Verslues et al. 2006). Dies wird durch eine erhöhte Wasseraufnahme oder eine Reduktion des Wasserverlusts erreicht, sodass sich auch unter diesen veränderten Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Wasseraufnahme und Wasserverlust einstellt. Als schnelle Antwort können Pflanzen mit einem Schließen der Spaltöffnungen reagieren. Längerfristige Anpassungsmaßnahmen sind

- die Vergrößerung des Verhältnisses von Wurzel zu Spross,
- die Erhöhung der Wasserspeicherkapazität des Gewebes
- und die Verdickung sowie die Reduktion der Wasserdurchlässigkeit der Kutikula (Verslues et al. 2006).
- Die Tolerierung des reduzierten Wassergehalts im Gewebe ist eine ergänzende oder alternative Anpassungsstrategie.

Anpassungsmechanismen ermöglichen die Reduktion des Wasserpotentials der Pflanzenzelle unter Verhinderung von Wasserverlust (Verslues et al. 2006). Ob Wasser in eine Zelle einströmen kann oder ausströmt, hängt vom ψ_w -Gradienten zwischen Zelle und Zellumgebung ab. Für alle Zellen, die Wasser aus der Erde oder dem Nährmedium

aufnehmen, muss das ψ_w geringer sein als das ψ_w des Bodens oder des Nährmediums. ψ_w von Pflanzenzellen kann durch die Formel

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$$

beschrieben werden (Verslues et al. 2006).

Dabei ist ψ_s das osmotische Potenzial, das von der Konzentration osmotisch aktiver Teilchen abhängig ist. ψ_p ist der Turgordruck, der dem Potenzial des Drucks durch die Zellwand entspricht.

Mechanismen, um den ψ_w in der Pflanzenzelle zu verringern, sind die Akkumulierung osmotisch aktiver Teilchen und die Verdickung der Zellwand. Die Akkumulation von Osmolyten erfolgt proportional zur Änderung des externen osmotischen Potenzials (Hasegawa et al. 2000). Osmolyte schützen die Zellstrukturen und helfen, das osmotische Gleichgewicht aufrechtzuhalten. Sie dürfen nicht mit dem Zellstoffwechsel interferieren. Osmolyte sind Zucker (z. B. Saccharose oder Fruktose), Zuckeralkohole (z. B. Glycerol oder methyliertes Inositol), komplexe Zucker (z. B. Trehalose oder Raffinose), Ionen (K^+) und geladene Metaboliten (z. B. Prolin). Durch die Bindung an Proteine und Membranen können Osmolyte die Proteinfaltung oder die Membranintegrität stabilisieren (Hasegawa et al. 2000).

Unter vielen Bedingungen abiotischen Stresses, auch bei Trocken-, Salz- oder Kältestress, kann ein Anstieg der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies, der **Reactive Oxygen Species** (ROS), beobachtet werden (Huang et al. 2012). Dies kann auf eine stressabhängige Störung des metabolischen Gleichgewichts zurückgeführt werden. ROS sind sehr reaktiv und toxisch und können Schäden an Proteinen, Lipiden, der DNA und an Kohlenwasserstoffen hervorrufen (Hasegawa et al. 2000). Für einige Osmolyte konnte eine Funktion bei der Regulierung der ROS-Konzentration beobachtet werden (Hasegawa et al. 2000).

Auch die Elastizität der Zellwand hat einen deutlichen Einfluss auf das Wasserpotenzial der Zelle (Verslues et al. 2006). Bei Reduktion des Wassergehalts der Zelle nimmt das Volumen der Vakuole ab. Wenn die Zellwand elastisch ist, schrumpft die Zelle. Dies bedeutet, dass die Zellwand das Zellinnere weiterhin eng umschließt und der Turgor und damit das Wasserpotenzial hoch bleiben. Wenn die Zellwand keine Elastizität zeigt, kommt es bei Wasserverlust nur zu einer geringen Änderung des Zellvolumens, und der Turgor nimmt ab, wodurch das Wasserpotenzial der Zelle abnimmt.

Ein Rezeptor für osmotischen Stress in Pflanzen ist noch nicht bekannt. Sicher ist, dass die Plasmamembran bei der Wahrnehmung externer Signale, hier osmotischer Stress, eine zentrale Rolle spielt (Huang et al. 2012). Es wurde diskutiert, ob abiotischer Stress über Eigenschaften der Membran wie Lipidzusammensetzung oder Fettsäurenkomposition

wahrgenommen wird. Die Signalweiterleitung des osmotischen Stresses erfolgt auf einem von dem Phytohormon Abscisinsäure („**ab**scisic **a**cid“, ABA) abhängigen und einem ABA-unabhängigen Weg (Zhu 2002; Huang et al. 2012). Der Zusammenhang zwischen ABA und osmotischem Stress wird auch dadurch deutlich, dass die ABA-Biosynthese durch osmotischen Stress reguliert wird (Zhu 2002). Auch ROS können bei osmotischem Stress als Signalmoleküle fungieren (Huang et al. 2012). Weitere für die Weiterleitung osmotischen Stresses wichtige sekundäre Botenstoffe sind Ca^{2+} und Phospholipide (Huang et al. 2012).

1.4 ABA, das Signalhormon für abiotischen Stress

ABA gehört zu den Pflanzenhormonen und beeinflusst die Entwicklung der Pflanzen und deren Stressadaptationsprozesse. ABA ist ein Sesquiterpen der IUPAC- (**I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**ppplied **C**hemistry-) Nomenklatur (S)-5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-1-cyclohexyl)-3-methyl-cis,trans-Penta-2,4-diensäure. In Abbildung 1-7 ist die Struktur des biologisch vorkommenden S-ABA-Enantiomers dargestellt.

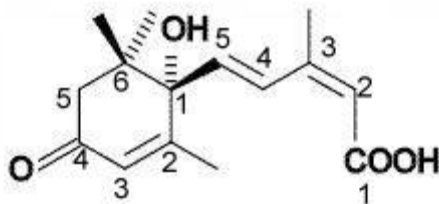


Abbildung 1–7: Biologisch vorkommendes S-ABA.

1.4.1 Funktion der ABA

Eine zentrale Funktion der ABA konnte in vielen Entwicklungsprozessen gezeigt werden: Die ABA fördert die Trockenresistenz von Samen, die Aufrechterhaltung der Samenruhe (Dormanz) und in frühen Embryonalstadien die Bildung von Speicherproteinen (Lipiden/Proteinen) sowie die Keimlingsentwicklung (Finkelstein et al. 2002). Auch konnte die Funktion der ABA bei der abiotischen Stressantwort gezeigt werden; daher wird die ABA auch als abiotisches Stresshormon bezeichnet (Leung und Giraudat 1998; Hasegawa et al. 2000; Zhu 2002). So werden durch die ABA das Schließen der Spaltöffnungen und damit die Reduktion des durch Transpiration bedingten Wasserverlusts vermittelt (Leung und Giraudat 1998; Schroeder et al. 2001a; Zhu 2002). Unter abiotischem Stress, besonders bei Trocken- und Salzstress, akkumulieren Pflanzen große Mengen von ABA, begleitet von wesentlichen Änderungen der Genexpression (Qin et al. 2011). Für viele ABA-induzierte Gene konnte eine Funktion bei der abiotischen Stressresistenz, z. B. bei der Osmolyt-Biosynthese, nachgewiesen werden (Leung und Giraudat 1998; Hasegawa et al. 2000; Zhu 2002; Nambara et al. 2002).

1.4.2 Der ABA-Rezeptor und die ABA-Signaltransduktion

2009 gelang zwei Gruppen die Identifizierung einer Proteinfamilie als ABA-Rezeptoren (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Diese Proteinfamilie wurde als „**P**yrabactin **R**esistance“/„**P**yrabactin Resistance **L**ike“ (PYR/PYL) (Park et al. 2009) oder als „**R**egulatory **C**omponents of **A**BA **R**eceptor“ (RCAR) (Ma et al. 2009) bezeichnet. Die PYR/PYL-RCAR-Proteinfamilie umfasst in *A. thaliana* 14 Mitglieder. Die biologische Relevanz dieser ABA-Rezeptoren *in planta* konnte über einen ABA-hypersensitiven Phänotyp zweier RCAR1-Überexpressoren gezeigt werden, der sich bei der Samenkeimung, dem Schließen der Stomata und dem Wurzelwachstum zeigte (Ma et al. 2009). Des Weiteren weist die ABA-Rezeptor-Quadrupelmutante *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* eine ABA-Insensitivität bei der Samenkeimung, dem Wurzelwachstum und der induzierten Genexpression auf (Park et al. 2009). Ma et al. (2009) gelang die Identifizierung von RCAR1 über die Suche nach Interaktoren der bekannten Komponenten der ABA-Signaltransduktion „**A**BA **i**nsensitive **1** and **2**“ (ABI1/2). Mit einer alternativen Strategie der Verwendung des synthetischen Inhibitors der Samenkeimung, Pyrabactin (Zhao et al. 2007), dessen Funktion als ABA-Antagonisten bei der Samenreife Park et al. zeigen konnten, gelang die Identifizierung einer pyrabactinresistenten Mutante PYR1 (Park et al. 2009). Infolge dieser beiden Veröffentlichungen gelang es, den ABA-Signaltransduktionsweg von der ABA-Bindung bis zur Phosphorylierung eines Transkriptionsfaktors oder Anionenkanals *in vitro* zu rekonstruieren (Fujii et al. 2009; Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011, Brandt et al., 2012). Fuji et al. konnten 2009 zeigen, dass ein „Grundgerüst“ aus wenigen Komponenten für die ABA-Signaltransduktion von der ABA-Bindung bis zur transkriptionellen Regulierung ausreichend ist. Das „Grundgerüst“, das zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors führt, setzt sich aus dem Rezeptor PYR/PYL-RCAR1, einer Gruppe von Typ-A-PP2C-Phosphatasen (z. B. ABI1 und ABI2), die durch den ABA-Rezeptor-Komplex inhibiert werden, und einer durch die PP2Cs regulierten Gruppe der „**S**NF1-**r**elated protein **k**inase **2**“ (SnRK2) (z. B. SnRK2.6 Open Stomata 1, OST1) zusammen. Abbildung 1-8 gibt einen schematischen Überblick über die regulatorischen Zusammenhänge.

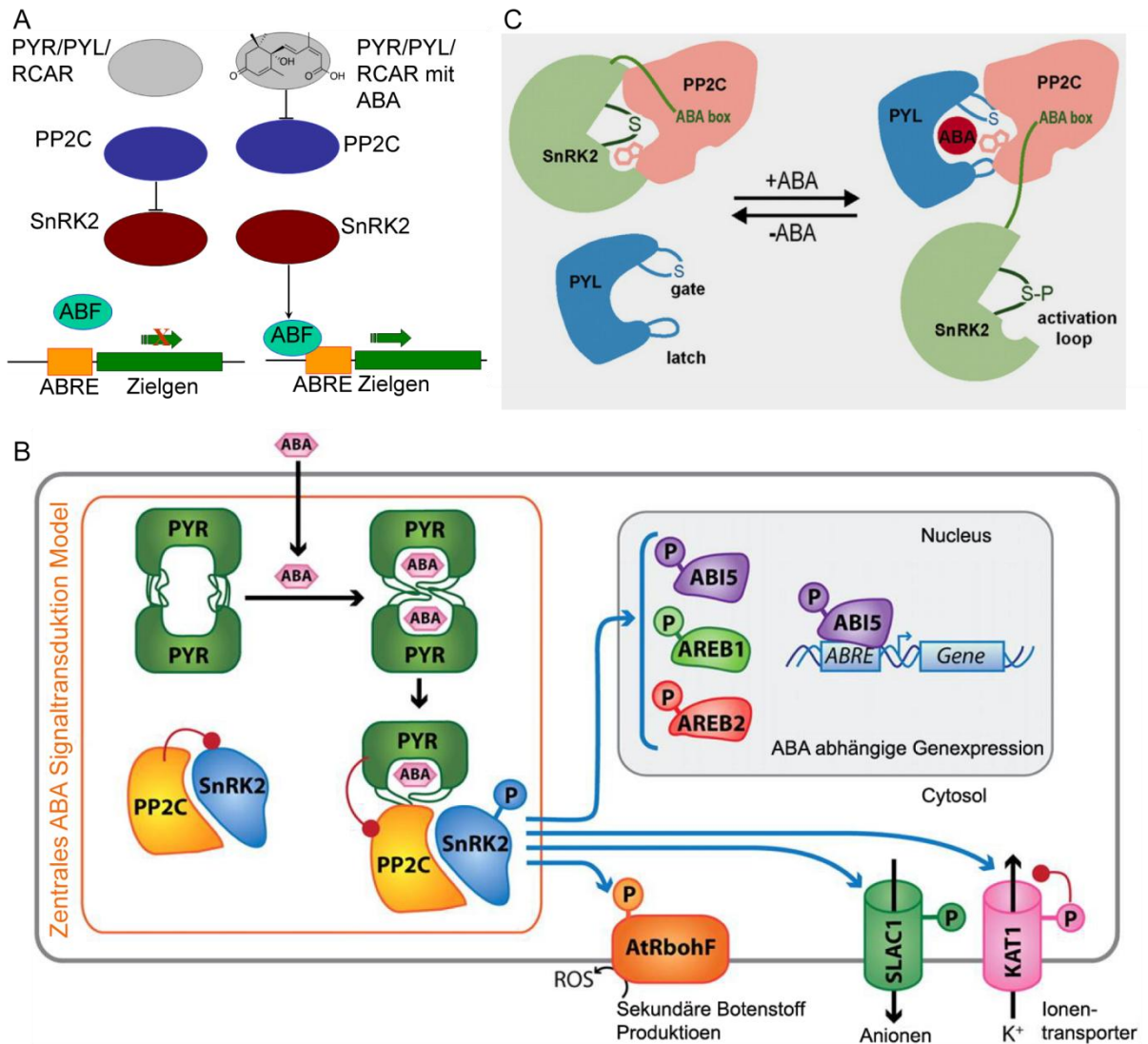


Abbildung 1–8: Schematische Darstellung der ABA-Signaltransduktion.

(A) – Schematischer Überblick über die regulatorischen Zusammenhänge des RCAR-PYR/PYL-PP2C-SnRK2-Signaltransduktionsweges. Ohne ABA wird SnRK2 durch PP2C in einem inaktiven Zustand gehalten. Nach ABA-Bindung an den ABA-Rezeptor (RCAR-PYR/PYL) inhibiert dieser PP2C, wodurch SnRK2 ihre aktive Konformation erhält. Die aktive SnRK2 phosphoryliert/aktiviert ihre Interaktionspartner, z. B. hier einen Transkriptionsfaktor der Familie der „**AB**RE-binding **F**actors“ (ABF), auch „**A**bscissic Acid **R**esponsive **E**lements-**B**inding factor“ (AREB) genannt. Der phosphorylierte ABF/AREB bindet im Promoterbereich an ein für ABA-induzierte Gene charakteristisches cis-Element „**Ab**scissic Acid **R**esponsive **E**lement“ (ABRE). Es kommt zur Transkription ABA-regulierter Gene. (B) – Grundgerüst des ABA-Signalweges, nach Hubbard et al. (2010) modifiziert. Die ABA-Bindung erfolgt an PYR/PYL-RCAR-Dimere. Die Bildung eines ABA-PYR/PYL-RCAR-PP2C-Komplexes kann nur nach ABA-PYR/PYL-RCAR-Monomer-Entstehung erfolgen. Diese Komplexbildung verhindert die Inaktivierung der SnRK2s durch PP2Cs, was eine Autophosphorylierung und Aktivierung der SnRK2 ermöglicht. Viele direkt durch SnRK2 regulierte Komponenten der ABA-Signaltransduktion konnten beschrieben werden. Dabei handelt es sich um im Nucleus lokalisierte Transkriptionsfaktoren, aber auch um plasmamembranale Proteine. Ihre Aktivierung/Deaktivierung resultiert aus einer Regulation der sekundären Botenstoffproduktion, dem Ionentransport und der Genregulation. Eine rote Verbindungslinie links vom Protein stellt eine inhibitorische Interaktion dar. (C) – Schematische Zusammenfassung der SnRK2-PP2C- und PP2C-ABA-Rezeptor-Interaktion aufgrund von Röntgenkristallstrukturanalysen (Soon et al. 2012). Ohne ABA kommt es zur SnRK2-PP2C-Interaktion. Die PP2Cs dephosphorylieren SnRK2s in der als „active loop“ bezeichneten Struktur und blockieren das aktive Zentrum der SnRK2. Der ABA-Rezeptor-Komplex ermöglicht durch die Bindung der PP2C eine Freisetzung der SnRK2. Nach der ABA-Bindung an den Rezeptor kommt es zum Schließen der „gates“ (Tore) und des „latch“ (Riegels). Das an der ABA-

Bindung direkt beteiligte Tryptophan, das „lock“ (Schloss) der PP2C, ist mit dem aromatischen Indol-Ringsystem schematisch dargestellt.

Sechs PP2C-Phosphatasen, ABI1, ABI2, HAB1, HAB2 („Homology to ABA Insensitive“ 1 und 2) sowie AHG1 und AHG3 („ABA-Hypersensitive Germination“ 1 und 3), konnten als negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion bei der Samenkeimung, dem Schließen der Stomata, dem Wurzelwachstum oder der Genregulation beschrieben und charakterisiert werden (Koorneef et al. 1984; Leung et al. 1994; Meyer et al. 1994; Rodriguez et al. 1998; Leonhardt et al. 2004; Saez et al. 2004; Kuhn et al. 2006; Yoshida et al. 2006; Nishimura et al. 2007). 2002 wurde eine Kinase mit einer ABA-abhängigen Aktivität als positiver Regulator des ABA-induzierten Schließens der Stomata und der ABA-abhängigen Genregulation identifiziert (Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2002). Diese Kinase wurde nach dem Funktionsverlust-Phänotyp als „Open Stomata 1“ (OST1) oder SnRK2.6 bezeichnet. Zwei weitere homologe Kinasen (SnRK2.2 und SnRK2.3) konnten als positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion beschrieben werden (Fujii et al. 2007). Die *SnRK2.2-SnRK2.3-SnRK2.6*-Tripelmutante zeigte beim Schließen der Stomata, der Samenkeimung, dem Keimlingswachstum und der ABA-induzierten Genexpression einen starken ABA-abhängigen Phänotyp (Fujii und Zhu 2009). Der Trippelmutanten-Phänotyp ist in seiner Ausprägung mit dem ABA-Synthese-defizienter Mutanten vergleichbar. Dies deutet auf die wichtige Funktion dieser Kinasen für die ABA-Signaltransduktion hin.

Für die PP2Cs ABI1, ABI2 und HAB1 konnten eine Interaktion mit verschiedenen PYR/PYL-RCAR und eine ABA-PYR/PYL-RCAR-abhängige Reduktion der Phosphataseaktivität gezeigt werden (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Neue Erkenntnisse über den ABA-regulatorischen Komplex konnten aus Kristallstrukturanalysen von PYR/PYL-RCAR in ABA-gebundener und ABA-ungebundener Form sowie dem tertiären ABA-PYR/PYL-RCAR-ABI1-Komplex gewonnen werden (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Yin et al. 2009; Cutler et al. 2010; Melcher et al. 2010; Peterson et al. 2010; Umezawa et al. 2010; Dupeux et al. 2011; Santiago et al. 2012). Die ABA-Bindung an den Rezeptor erfolgt über eine Kombination polarer und unpolarer Interaktionen in einer Tasche, die von sieben antiparallelen β -Faltblättern und zwei angrenzenden α -Helices gebildet wird. Die ABA-Bindestelle wird von zwei konservierten Schleifen flankiert, die als „gate“ (Tor) und „latch“ (Riegel) bezeichnet werden. Nach der ABA-Bindung kommt es zum Schließen der „gates“, und der „gate latch“ (Torriegel) stabilisiert das ABA-Molekül in der Bindetasche (Abbildung 1-8, [C]). Das Schließen der „gates“ führt zur Entstehung einer PP2C-Interaktionsstelle; bei der Interaktion scheint das „gate“ die aktive Stelle der PP2C zu blockieren und in einem inaktiven Zustand zu halten (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2012). Für ein in den PP2Cs der ABA-Signaltransduktion konserviertes Tryptophan konnte eine Insertion zwischen „gate“ und

„latch“ gezeigt werden; daher wird diese Aminosäure auch als „lock“ (Schloss) bezeichnet (Abbildung 1-8, [C]). Dieses Tryptophan interagiert über eine Wasserstoffbrückenbindung direkt mit dem ABA in der Rezeptor-Bindetasche (Abbildung 1-8, [C]). Dies könnte auf eine mögliche stabilisierende Wirkung der PP2C auf den ABA-Rezeptor-Komplex hindeuten (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Joshi-Saha et al. 2011; Santiago et al. 2012). Diese These wird durch die Messung der Dissoziationskonstanten des ABA-Rezeptor-Komplexes unterstützt. Hierbei konnten bei vier der untersuchten PYR/PYL-RCAR Dissoziationskonstanten (Kd)-Werte im μM -Bereich ermittelt werden, wohingegen die Kd-Werte durch Zugabe einer PP2C in den physiologischen nM-Bereich sanken (Ma et al. 2009; Park et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Szostkiewicz et al. 2010).

Der Zusammenhang zwischen den beschriebenen PP2Cs und SnRK2s konnte 2009 gezeigt werden (Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009). Es gelang für die verschiedenen SnRK2s, die Dephosphorylierung (Serin 175 in SnRK2.6/OST1) und Inaktivierung durch ABI1, ABI2 und HAB1 nachzuweisen. Die Phosphorylierung an Serin 175 ist für die OST1-Aktivität notwendig (Belin et al. 2006; Vlad et al. 2009). Serin 175 ist in der Aktivierungsschleife („activation loop“) lokalisiert. 2012 wurde die Kristallstruktur des OST1-HAB1-Komplexes veröffentlicht (Soon et al. 2012). Durch die PP2C-Interaktion scheint das aktive Zentrum von OST1 blockiert zu sein. Dies könnte die These einer dauernden Dephosphorylierung von OST1 durch die PP2C erweitern (Abbildung 1-8, [C]). Interessanterweise scheint OST1 den ABA-Rezeptor in der PP2C-Interaktion nachzuahmen, was bedeutet, dass dieselbe Konformation der PP2C unter Beteiligung derselben Aminosäuren auftritt (Soon et al. 2012). Neben dem an der PP2C-Interaktion beteiligten aktiven Zentrum von OST1 konnte auch eine als ABA-Box bezeichnete Region als interagierende Domäne identifiziert werden (Belin et al. 2006).

Als ABA-abhängige, durch OST1 Phosphorylierung aktivierte Transkriptionsfaktoren konnten ABI5 (Nakashima et al. 2009) und ABF2 (Fujii et al. 2009) identifiziert werden. Auch beim Schließen der Stomata wurden OST1-abhängige Komponenten identifiziert. Hierbei handelte es sich um den Anionenkanal „Slow Anion Channel-Associated 1“ (SLAC1) (Geiger et al. 2009), den Kaliumkanal „K⁺-Channel in A. thaliana 1“ (KAT1) (Sato et al. 2009) und das ROS-produzierende Enzym „Respiratory burst oxidase homolog F“ (RbohF) (Sirichandra et al. 2009) (Abbildung 1-8, [B]). In der Literatur werden noch drei weitere Gruppen von ABA-Rezeptoren beschrieben. Da die Funktionalität dieser Gruppen umstritten ist und deren Integration in die ABA-Signaltransduktion experimentell nicht überzeugend nachgewiesen scheint (Hubbard et al. 2010; Klingler et al. 2010; Raghavendra et al. 2010; Guo et al. 2011), wird in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen.

1.4.3 ABA-abhängige Regulation der Stomata

Das ABA-induzierte Schließen der Stomata erfolgt durch eine Reduktion des Turgors in den Schließzellen (Schroeder et al. 2001a; Joshi-Saha et al. 2011). Die Reduktion des Turgors ist die Folge eines auswärts gerichteten Anionen- und Kaliumionenstroms. Schematisch dargestellt sind die am Schließen der Stomata beteiligten Faktoren in Abbildung 1-9. Das erste durch den ABA-Anstieg induzierte Ereignis beim Schließen der Stomata ist die Produktion von ROS, dies hat durch Freigabe aus intrazellulären Speichern oder durch Einstrom durch die Plasmamembran einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zur Folge (Schroeder et al. 2001b; Joshi-Saha et al. 2011). Die ansteigende Ca^{2+} -Konzentration aktiviert Anionenkanäle. Der dadurch zustande kommende auswärts gerichtete Anionenstrom in die Apoplasten führt zur Depolarisation der Plasmamembran. Durch die Ca^{2+} -abhängige Inhibierung der H^+ -ATPasen, einer ATP-hydrolysierenden Protonenpumpe, und einwärts gerichteter Kaliumkanäle werden die Hyperpolarisation der Plasmamembran und die Ionenaufnahme verhindert. Die Depolarisation der Membran und die ABA-abhängige Erhöhung des pH-Werts induzieren auswärts gerichtete Kaliumkanäle. Die aus dem auswärts gerichteten Kalium- und Anionenstrom folgende Reduktion des Turgors führt zum Schließen der Stomata. Mehr als 90 % der beim Schließen der Stomata ausströmenden Ionen sind in der Vakuole der Stomata gelagert; daher ist die Regulierung des vaskulären Ionentransports ein wichtiger Aspekt des ABA-induzierten Schließens der Stomata (Schroeder et al., 2001a, Schroeder et al. 2001b), auf den hier aber nicht weiter eingegangen wird. Bekannt sind mehrere durch OST1 in ihrer Aktivität regulierte Proteine in den Stomata (Geiger et al. 2009; Sato et al. 2009; Sirichandra et al. 2009). Dies verbindet wichtige Komponenten des ABA-abhängigen Schließens der Spaltöffnung mit dem PYR/PYL-RCAR1-PP2C-SnRK2-Komplex. Für SLAC1 gelang es, *in vitro* die OST1-abhängige Phosphorylierung des SLAC1-N-Terminus in Abhängigkeit vom ABA-RCAR1-ABI1-Komplex zu zeigen, was auf eine ähnliche Regulierung wie die in Abschnitt 1.4.2 beschriebene hindeutet (Geiger et al. 2009).

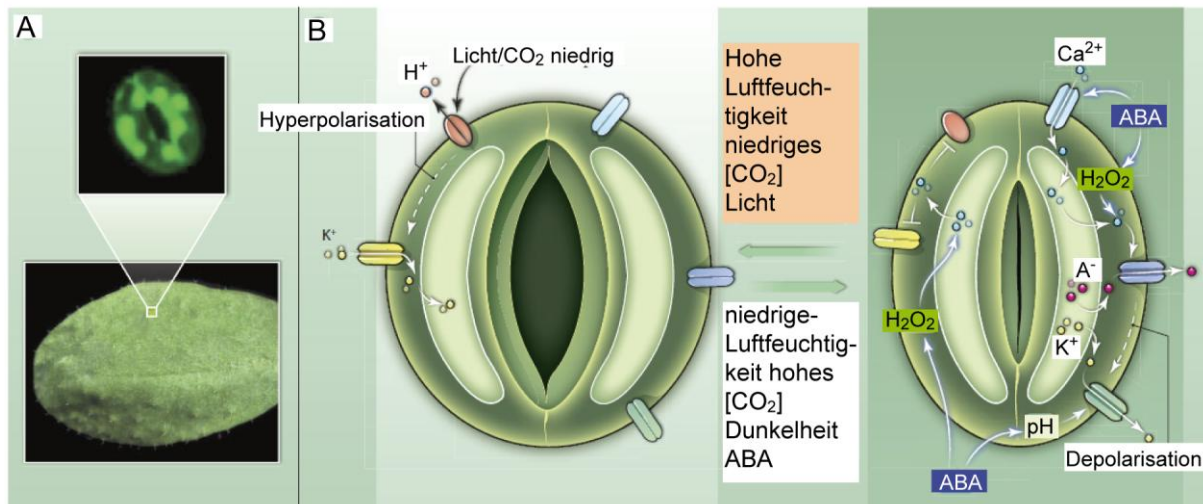


Abbildung 1–9: Biophysik der Spaltöffnungsbewegung.

Abbildung nach Joshi-Saha et al. (2011). (A) – Abbildung einer einzelnen Spaltöffnung; die grüne Fluoreszenz zeigt die Chloroplasten. (B) – Schematische Darstellung einer offenen (links) und einer geschlossenen (rechts) Spaltöffnung. Eine Zunahme des Turgors führt zum Anschwellen der Zellen und zur Bildung einer Pore. Die Akkumulation von ABA durch Wassermangel führt zum auswärts gerichteten Kalium- und Anionenstrom. Die dadurch induzierte Reduktion des Turgors resultiert aus dem Schließen der Stomata. Das erste messbare Signal beim Schließen der Stomata ist die Zunahme von ROS, das einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induziert. Die ansteigende Ca^{2+} -Konzentration induziert einen auswärts gerichteten Anionenstrom über Anionenkanäle, der zur Depolarisation der Plasmamembran führt. Auswärts gerichtete Kaliumkanäle werden durch die Depolarisation der Membran und durch pH-Wert-Änderungen induziert. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration führt zur Inhibierung der H^+ -ATPasen und zur Inhibierung einwärts gerichteter Kaliumkanäle. Da > 90 % der beim Schließen der Stomata ausströmenden Ionen in der Vakuole gelagert werden, müssen die Ionen die Vakuolenmembran passieren. Rot: H^+ -ATPase; gelb: einwärts gerichteter Kaliumkanal; grün: auswärts gerichteter Kaliumkanal; hellblau: Ca^{2+} -Kanal; dunkelblau: Anionenkanal

1.5 Genregulation in Abhängigkeit von ABA und abiotischem Stress

Für fast 10 % der proteinkodierenden Gene in *Arabidopsis* konnte eine Regulation durch ABA gezeigt werden (Nemhauser et al. 2006). Ein Teil der durch ABA-induzierten Gene kodiert für Proteine, die Stressantwort- und Stressassoziiert sind (z. B. „Late Embyrogenesis Abundant“- [LEA]-Proteine), regulatorische Proteine (z. B. Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen), verschiedene Transporter sowie Proteine und Enzyme, die an der Osmolytbiosynthese beteiligt sind (z. B. Fettsäuremetabolismus) (Fujita et al. 2011). Die Stressantwort assoziierten LEA-Proteine werden in der späten Embryogenese stark exprimiert (Leung und Giraudat 1998). Diese Entwicklungsphase ist durch ein starkes Austrocknen des Embryos gekennzeichnet, und viele dieser LEA-Proteine schützen den Embryo vor Trockenschäden. Für zahlreiche LEA-Proteine konnten auch in späteren Entwicklungsphasen eine Trocken- und Frostschutzfunktion gezeigt werden (Leung und Giraudat 1998). Die meisten dieser ABA-induzierten Gene enthalten in ihrem Promoterbereich konservierte ABRE-*cis*-Elemente (Leung und Giraudat 1998; Zhang et al. 2005; Fujita et al. 2011). Für die ABA-abhängige Transkription müssen mindestens zwei ABRE- oder andere ABA-*cis*-Elemente vorhanden sein (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki

2006; Fujita et al. 2011). Die Transkription dieser Gene wird hauptsächlich durch zwei Familien von bZIP-Transkriptionsfaktoren reguliert (Fujita et al. 2011). Genauer reguliert ABI5 in Samen und die AREB/ABF-Transkriptionsfaktorfamilie in den vegetativen Entwicklungsstadien die Transkription ABRE- und ABA-abhängiger Gene. Zur AREB/ABF-Familie gehören AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF1 und ABF3, die im vegetativen Gewebe hauptsächlich unter Bedingungen abiotischen Stresses exprimiert sind (Choi et al. 2000; Uno et al. 2000; Kang et al. 2002; Fujita et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 und ABF3 zur Aktivierung ABA benötigen (Uno et al. 2000; Fujita et al. 2005; Fujita et al. 2011). Die Aktivierung von AREB/ABF erfolgt durch eine ABA-abhängige Phosphorylierung einer konservierten Region durch SnRK2-Protein-Kinasen (Furhata et al. 2006; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006; Fujii et al. 2009). Für eine AREB1/ABF2-Phosphorylierungs-Mimikry-Variante konnte die Expression vieler ABA-abhängiger Gene ohne ABA beobachtet werden (Furhata et al. 2006). In Phosphorylierungs-Mimikry-Varianten werden die konservierten Aminosäuren Serin oder Threonin gegen Asparaginsäure ausgetauscht. Die negativ geladene Asparaginsäure weist ähnliche biochemische Eigenschaften wie phosphoryliertes Serin bzw. Threonin auf. Es gibt auch eine ABA-unabhängige durch abiotischen Stress bedingte Genregulierung. Interessanterweise konnten auch Gene identifiziert werden, die transkriptionell i) ABA-abhängig oder ii) abiotischen Stress-abhängig unabhängig von ABA hochreguliert werden können, z. B. **Responsive to Dessication **29A**** (RD29A) (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Ein ABA-unabhängiges *cis*-Element ist z. B. **Drought-Responsive Element** (DRE), das in Promoterregionen kälte- und trockenstressabhängiger Gene vorkommt. Im Promoter von RD29A kommt neben einem DRE auch ein ABRE-Element vor, was auf eine ABA-abhängige und ABA-unabhängige Regulation hindeutet (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Die gegenseitige Beeinflussung der ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen von abiotischem Stress-abhängigen Genregulation wird noch nicht vollständig verstanden.

1.6 CDPKs in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort

In der Literatur wurden CDPKs als Regulatoren in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort beschrieben. Viele Untersuchungen erfolgten mit stabilen Überexpressionslinien oder T-DNA-Insertionsmutanten. Diese Untersuchungen sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst.

Tabelle 1–2: Untersuchungen von CDPKs in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort mit stabilen Überexpressionslinien und T-DNA-Insertionslinien.

CDPK	Beschreibung	Referenz
AtCPK3	Zwei <i>Atcpk3</i> -T-DNA-Insertionslinien zeigten bei Salzstress eine reduzierte Keimungsrate und ein <i>AtCPK3</i> -Überexpressor eine erhöhte Keimungsrate.	Mehlmer et al. (2010)
AtCPK3 und AtCPK6	Eine Störung des Anionenstroms beim Schließen der Stomata zeigte sich auch in der <i>Atcpk3/Atcpk6</i> -Doppelmutante.	Mori et al. (2006)
AtCPK3, AtCPK4, AtCPK6, AtCPK7, AtCPK8, AtCPK11, und AtCPK32	In der <i>Atcpk3/Atcpk6</i> -Doppelmutante, in der <i>Atcpk4/Atcpk11</i> -Doppelmutante, in der <i>Atcpk10</i> und in der <i>Atcpk7/Atcpk8/Atcpk32</i> -Trippelmutante ist das durch Ca^{2+} -Oszillation induzierte Schließen der Stomata gestört.	Hubbard et al. (2012)
AtCPK6	Für einen <i>AtCPK6</i> -Überexpressor konnte eine erhöhte Trocken- und Salzstresstoleranz sowie eine erhöhte Expression vieler abiotischen Stress-Markergene beobachtet werden.	Xu et al. (2010)
AtCPK6	In der <i>Atcpk6</i> -Mutante war das methyljasmonatabhängige Schließen der Spaltöffnungen gestört.	Munemasa et al. (2011)
AtCPK4 und AtCPK11	<i>Atcpk4</i> - und <i>Atcpk11</i> -Einzel- und -Doppelmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine bessere Keimung auf ABA und Salz sowie eine Reduktion des ABA-abhängigen Schließens der Stomata, eine erhöhte Trockenstresssensitivität und eine reduzierte Expression abiotischer Stress-abhängiger Gene. Der Phänotyp war in der Doppelmutante ausgeprägter als in den Einzelmutanten. <i>AtCPK4</i> - und <i>AtCPK11</i> -Überexpressionslinie zeigten einen den Mutanten konträren Phänotyp.	Zhu et al. (2007)

Fortsetzung Tabelle 1–2

CDPK	Beschreibung	Referenz
AtCPK10	In der <i>Atcpk10</i> -Mutante waren das ABA- und Ca^{2+} -abhängige Schließen der Spaltöffnungen und die Inhibition des Öffnens der Stomata gestört. In der <i>cpk10</i> konnte in Spaltöffnungen eine Störung des durch ABA und Ca^{2+} inhibierten K^+ -Einstroms beobachtet werden. Ein <i>AtCPK10</i> -Überexpressor zeigte eine erhöhte Trockenstressresistenz und die <i>Atcpk10</i> den gegenteiligen Phänotyp.	Zou et al. (2010)
AtCPK12	Für <i>AtCPK12</i> -RNAi-Linien konnte bei der Samenkeimung, dem Keimlingswachstum und der Expression einiger ABA-abhängiger Gene ein ABA-hypersensitiver Phänotyp beobachtet werden.	Zhao et al. (2011a)
AtCPK12	In der Überexpressionslinie der <i>AtCPK12</i> konnte bei der Samenkeimung und dem Keimlingswachstum eine Hypersensitivität gegenüber ABA beobachtet werden.	Zhao et al. (2011b)
AtCPK21	Für eine <i>Atcpk21</i> -T-DNA-Insertionslinie konnte eine erhöhte osmotische Stressresistenz beschrieben werden. ^a	Franz et al. (2011)
AtCPK23	Für eine T-DNA-Insertionslinie der <i>AtCPK23</i> konnte eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Trockenstress- und Salzstressresistenz sowie reduzierte Stomataöffnung beschrieben werden. Das Verhältnis von Kalium zu Natrium war in der <i>Atcpk23</i> zugunsten von Kalium verschoben, was auf eine erhöhte Resistenz gegenüber Salzstress aufgrund einer schwächeren Inhibition K^+ -abhängiger Enzyme durch das chemisch ähnliche Natrium hindeuten könnte. Ein <i>AtCPK23</i> -Überexpressor zeigte eine erhöhte Sensibilität gegenüber Trockenstress und eine vergrößerte Stomataöffnung.	Ma und Wu (2007)
AtCPK32	In der Überexpressionslinie der <i>AtCPK32</i> konnten bei der Samenkeimung eine Hypersensitivität gegenüber ABA und eine Hochregulierung einiger ABA-abhängiger Gene gezeigt werden.	Choi et al. (2005)
Reis OsCDPK7	Überexpression der <i>OsCDPK7</i> führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer erhöhten Trocken-, Kälte- und Salzstressresistenz. Des Weiteren konnte nach Salz- und Trockenstress in der Überexpressionslinie eine erhöhte Expression abiotischer Stress-abhängiger Gene beobachtet werden.	Saijo et al. (2000)

^a Da die phänotypische Analyse der *Atcpk21-1-T-DNA-Linie* Teil dieser Arbeit ist, wird hier nicht weiter darauf eingegangen.

Auch wenn diese Untersuchungen einen funktionellen Zusammenhang zwischen einigen CDPKs und der abiotischen Stress- und ABA-Signalantwort aufweisen, sind die regulatorischen Zusammenhänge zwischen der CDPK-Funktion und der ABA- sowie abiotischen Stress-Signaltransduktion weitgehend unbekannt. Bei der Verwendung stabiler Überexpressions- und T-DNA-Insertionslinien erscheint die Unterscheidung zwischen i) sekundären Effekten, die durch tage- und wochenlange Überexpression oder das Fehlen einer funktionellen CDPK auftreten, und ii) Effekten, die durch die veränderte Funktion von CDPK in der schnellen abiotischen Stress-Signaltransduktion auftreten, nur eingeschränkt möglich. In diesem Zusammenhang erscheint eine Untersuchung interessant, die den Einfluss der transienten Expression zweier konstitutiv aktiver Varianten der *AtCPK10* und der *AtCPK30* auf die ABA-Signaltransduktion analysiert (Sheen 1996). Genauer konnte in Mais-Mesophyll-Zellprotoplasten gezeigt werden, dass die Expression der konstitutiv aktiven *AtCPK30* und *AtCPK10* zur Induktion abiotischer Stress- und ABA-abhängiger Promotoren führt. In diesen Untersuchungen wurden verkürzte, in ihrer Ca^{2+} -Bindedomäne deletierte und damit nicht Ca^{2+} -regulierte CDPK-Versionen verwendet; daher entsprechen diese Ergebnisse nur partiell der *in vivo* Situation.

Für einige CDPKs konnte eine Funktion bei der Regulierung der Stomataöffnung beobachtet werden (Tabelle 1-2). Interessanterweise konnten Störungen der für die Regulierung der Stomataöffnung wichtigen Ionenströme in den transgenen CDPK-Linien beobachtet werden (Mori et al. 2006; Zou et al. 2010). Auch konnte gezeigt werden, dass das durch Ca^{2+} -Oszillation induzierte Schließen der Stomata in mehreren CDPK-Mutanten gestört ist (Tabelle 1-2). Zusammenfassend könnte die Ca^{2+} -Oszillation zur Aktivierung verschiedener CDPKs in Stomatan führen, die dann zur Regulierung von K^{+} - und Anionenströmen beitragen. In diesem Zusammenhang sind die unten dargelegten Überlegungen zu *in vivo* Substraten interessant, da diese auch Anionenkanäle beinhalten (Tabelle 1-3).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass einige der in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort beschriebenen CDPKs auch in anderen Signaltransduktionswegen beschrieben wurden. So konnte gezeigt werden, dass die *AtCPK4*, *AtCPK6* und *AtCPK11* an der Pathogenabwehr beteiligt sind (Boudsocq et al. 2010). Dies weist auf eine hohe Komplexität der durch CDPKs regulierten Signaltransduktionswege hin und zeigt auf, dass dieselben CDPKs in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen könnten. Auch deutet sich dadurch die Problematik der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Signaltransduktionswege an. Des Weiteren weist die Tatsache, dass die *AtCPK12*-Überexpressor- und *AtCPK12*-RNAi-Linien ähnliche und nichtkonträre Phänotypen aufweisen, auf eine höhere Komplexität der *AtCPK12*-abhängigen Signaltransduktion hin (Tabelle 1-2).

Ein Ansatz, den regulatorischen Zusammenhang zwischen der CDPK-Funktion und der abiotischen Stress- und ABA-Antwort weiter gehend zu untersuchen, ist die Identifizierung möglicher *in vivo* Substrate oder Interaktionspartner. Die bisher in der Literatur diskutierten *in vivo* Substrate und Interaktionspartner sind in Tabelle 1-3 zusammengefasst.

Tabelle 1–3: Übersicht der diskutierten CDPK-Interaktoren und *in vivo* Substrate.

CDPK	Substrat/Interaktor	Referenz
AtCPK4 AtCPK11	ABF1/ABF4	Zhu et al. (2007)
AtCPK6	„ <u>S</u> low <u>V</u> oltage <u>A</u> nion <u>C</u> hannel <u>1</u> “ (SLAC1)	Brandt et al. (2012)
AtCPK12	ABF4	Zhao et al. (2011a)
AtCPK12	ABI2	Zhao et al. (2011a)
AtCPK21	SLAC1	Geiger et al. (2010)
AtCPK21	„ <u>S</u> LAC1 <u>H</u> omologes <u>3</u> “ (SLAH3)	Geiger et al. (2011)
AtCPK23	SLAC1	Geiger et al. (2010)
AtCPK32	ABA-abhängiger Transkriptionsfaktor, „ <u>A</u> BRE-binding <u>F</u> actor“ ABF4	Choi et al. (2005)

Viele diskutierte Substrate wurden mit mehreren CDPKs in Verbindung gebracht. So wurde ABF4 als *in vivo* Substrat von AtCPK4, AtCPK11, AtCPK12 und AtCPK32 diskutiert (Tabelle 1-3). Die Identifizierung von ABF4 als Interaktionspartner erfolgte auf Grundlage von *in vitro* Analysen. So konnte für AtCPK32 die Interaktion mit dem Hefe-Zweihybrid- (Y2H-) System oder einem GST-„Pull-down“-Versuch gezeigt werden (Choi et al. 2005). Des Weiteren wurden *in vitro* Kinaseaktivitätsmessungen mit ABF4 (und ABF1 bei den Untersuchungen mit AtCPK4 und AtCPK11) als Substrat für alle postulierten Interaktionspartner durchgeführt. Aufgrund der großen Homologie zwischen den CDPK-Isoformen erscheint es fraglich, inwieweit diese *in vitro* Daten eine spezifische Interaktion belegen. Interessanterweise

konnte in den phänotypischen Untersuchungen stabiler transgener Linien für *AtCPK4*, *AtCPK11*, *AtCPK12* und *AtCPK32* eine veränderte Expression abiotischer Stress-abhängiger und ABA-abhängiger Gene beobachtet werden (Tabelle 1-2). Dies könnte auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen den untersuchten CDPKs und den ABF-Transkriptionsfaktoren hindeuten.

Die in der ABA-Signaltransduktion beschriebene Phosphatase ABI2 wird als Interaktionspartner von *AtCPK12* diskutiert (Tabelle 1-3). Zhao et al. (2011a) konnten für ABI2 als Interaktionspartner von *AtCPK12*

- im Y2H-System eine Interaktion nachweisen,
- in *in vitro* Kinaseaktivitätsmessungen eine *AtCPK12*-abhängige Phosphorylierung von ABI2 beobachten und
- in *in vitro* Phosphataseaktivitätsmessungen eine Zunahme der ABI2-Aktivität durch *AtCPK12* zeigen.

Da ABI2 auch in dieser Arbeit als Interaktionspartner von CDPKs untersucht wird, wird auf die Frage, inwieweit diese *in vitro* Daten eine spezifische Interaktion belegen, an anderer Stelle eingegangen (Abschnitt 4.2.6.1).

Für die in dieser Arbeit untersuchten CDPKs *AtCPK21* und *AtCPK23* konnten Anionenkanäle als *in vivo* Substrate beschrieben werden (Tabelle 1-3). Da die publizierten Artikel auch Ergebnisse dieser Arbeit beinhalten, wird in der Einleitung nicht weiter darauf eingegangen. Auf den in der Methodik und Forschungsstrategie sowie und von der Aussage sehr ähnlichen Artikel in der die Interaktion zwischen *AtCPK6* und SLAC1 untersucht wird, wird in der Diskussion eingegangen (Abschnitt 4.2.6.2).

Nach abiotischer Stressbehandlung konnte auch eine transkriptionelle Regulierung von CDPK-mRNA beobachtet werden (Tabelle 1-4).

Tabelle 1–4: Auswahl der Untersuchungen zur transkriptionellen Regulierung von CDPK-mRNA nach abiotischer Stress- und ABA-Behandlung.

CDPK	Abiotischer Stressbehandlung	Referenz
Reis <i>OsCDPK7</i>	Transkriptionsanstieg nach Kälte- und Salzstress	Saijo et al. (2000)
<i>AtCPK10</i> und <i>AtCPK11</i>	Transkriptakkumulation nach Salz- und Trockenstress	Urao et al. (1994)
Vicia faba <i>VfCDPK1</i>	Transkriptzunahme nach Trockenstress und ABA-Behandlung	Liu et al. (2006)
<i>AtCPK6</i>	Indizierung der Transkription nach Trocken- und Salzstress	Xu et al. (2010)

Dass transkriptionelle Regulierungen von CDPK-mRNA beobachtet werden konnten, deutet auf mögliche Zusammenhänge zwischen der CDPK-Funktion in der abiotischen Stress- und ABA-Antwort und den Mengen an CDPK-mRNA hin (Tabelle 1-4). Vermutlich führt eine erhöhte Menge an mRNA auch zu einer erhöhten Proteinmenge; die CDPK-Protein-Konzentration wurde in den meisten Studien aber nicht untersucht. Nur für die *AtCPK4* und *AtCPK11* wurde nach ABA-Behandlung ein Anstieg der Proteinmenge nachgewiesen (Zhu et al. 2007).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die abiotische Stress- und ABA-abhängige biochemische Aktivierung von CDPKs. Die schnelle Signaltransduktion erfolgt vermutlich primär über eine Zunahme der CDPK-Kinaseaktivität und nicht über die Regulierung der CDPK-Expression. Nur für wenige CDPKs konnte eine Zunahme der *in vivo* Kinaseaktivität nach abiotischen Stress- und ABA-Perzeption beobachtet werden. 2001 konnte eine ca. 65 kDa große Ca^{2+} -abhängige Kinase in Reis identifiziert werden, die nach Kältestressapplikation eine erhöhte Auto- und Transphosphorylierungsaktivität zeigte (Martín und Busconi 2001). An der *AtCPK11* und *AtCPK14* wurde nach ABA-Zugabe eine Zunahme der *in vivo* Kinaseaktivität beobachtet (Zhu et al. 2007). Auch die *AtCPK3*-Kinaseaktivität konnte transient in Protoplasten durch Salz und abgeschwächt durch andere Stressapplikationen induziert werden (Mehlmer et al. 2010). Für die in dieser Arbeit untersuchte *AtCPK21* konnte nach osmotischer Stressbehandlung eine Zunahme der *in vivo* Kinaseaktivität beobachtet werden (Franz et al. 2011).

1.7 Zielsetzungen

Durch funktionelle Untersuchungen von CPK21 und CPK23 in der schnellen ABA-Signaltransduktion als auch in der Langzeitadaptation an abiotischen Stress und die Identifizierung verschiedener *in vivo* Substrate oder Interaktoren sollte ein umfassendes Bild von CPK21- und CPK23-Funktion in der ABA- und abiotischen Stressantwort erhalten werden.

Für die *A. thaliana*-CDPKs CPK21 und CPK23 konnte in vorangegangenen funktionalen Untersuchungen eine Rolle bei der abiotischen Stressantwort gezeigt werden. Ausgehend von den vorhandenen Daten sollten weiterführende Untersuchungen der abiotischen Stressantwort mit Fokus auf der damit verbundenen ABA-Signaltransduktion durchgeführt werden. Die schnelle ABA-Signaltransduktion wurde transient in Protoplasten unter Verwendung eines Luciferasekonstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des Promoterbereichs des ABA-abhängigen Gens *Responsive to D*essication 29B (*RD29B*) untersucht. Die Untersuchungen zu Interaktionen und mögliche regulatorische Zusammenhänge zwischen den CDPKs CPK21, CPK23 und einigen ausgewählten Komponenten der ABA-Signaltransduktion umfassten als *in vivo* Interaktionsanalysen Coimmunopräzipitationen und Untersuchungen der CPK-abhängigen *in vivo* Phosphorylierung möglicher Interaktoren.

Neben den Untersuchungen der *in vivo* Funktion von CPK21 und CPK23 sollte die CPK23 biochemisch charakterisiert werden. Insbesondere sollte die Kinaseaktivität von CPK23 in Abhängigkeit von Ca^{2+} untersucht und mit der von CPK21 verglichen werden. Der Vergleich zweier so homologer Kinasen ermöglicht es, gegebenenfalls Unterschiede in der biochemischen Aktivität mit singulären Aminosäuresequenzunterschieden zu korrelieren und Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion zu erkennen. Dies würde wiederum erlauben unter Verwendung entsprechender transgener Mutanten neue Erkenntnisse in Bezug auf ihre Ca^{2+} -abhängige *in vivo* Aktivierung zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Bio-Rad (München), GE Healthcare (Freiburg), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Steinheim) verwendet. Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Ebersberg) oder Sigma (Steinheim) bezogen.

2.1.2 Verwendete Enzyme, Proteine, Peptide, Antikörper und Größenstandards

Tabelle 2–1: Verwendete Enzyme, Proteine, Antikörper und Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
Rinder Serum Albumin, minimum 98 % Reinheit (BSA)	Sigma (Steinheim)
Cellulase	Yakult (Japan)
CPK21-Pseudosubstratsegment-Peptid 21P1(AMNKLKKLALKVI)	JPT GmbH (Berlin)
DNase I, rekombinant, RNase-frei	Roche (Penzberg)
HyperLadder I [®]	Bioline (Luckenwalde)
L-Glutathion, reduziert	Applichem (Darmstadt)
Lysozym	Sigma (Steinheim)
Macerozym	Yakult (Japan)
MMLV, reverse Transkriptase M170	Promega (Mannheim)
PageRuler plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)
Pfu plus DNA-Polymerase	Roboklon (Berlin)
Rapid-Alkaline-Phosphatase	Roche (Penzberg)
Restriktionsendonukleasen vom Typ II	Fermentas (St. Leon-Rot)

Fortsetzung Tabelle 2–1

Bezeichnung	Hersteller
SLAC1.1-Peptid (RGPNRGKQRPFGRGFSRQVSL)	JPT GmbH (Berlin)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	Romeis-Labor (Berlin)
Strep-Tactin-AP-Konjugat	IBA (Göttingen)
Strep-Tactin-HRP-Konjugat	IBA (Göttingen)
anti-Maus IgG, AP-Konjugat	Sigma (Steinheim)
anti-Rat IgG, AP-Konjugat	Sigma (Steinheim)
anti-Maus IgG, HRP-Konjugat	Sigma (Steinheim)
anti-HA	Roche (Penzberg)
anti-GFP	Roche (Penzberg)

2.1.3 Verwendete Medien

Tabelle 2–2: Verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung/Hersteller
LB-Medium nach Bertani (1951)	1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, pH 7,0 (eingestellt mit 1 M NaOH); nach dem Autoklavieren Zugabe von Antibiotika
MS-(Murashige-Skoog-) Medium	MS-Medium wurde bereitgestellt von Duchefa Biochemie (Niederlande); der pH-Wert wurde mit KOH auf 5,7 eingestellt.

2.1.4 Verwendete *E.coli*-Stämme

Zur Expression rekombinanter Enzyme in *E. coli* wurde der Stamm BL21 (DE3) verwendet. In allen sonstigen molekularbiologischen Arbeiten wurde der Stamm DH10B verwendet.

Tabelle 2–3: Verwendete *E.coli*-Stämme

Stamm	Unternehmen/Referenz	Genotyp
DH10B	Grant et al. (1990)	<i>E.coli</i> F ⁻ <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU galK</i> _- <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>
BL21 (DE3)	Stratagen	<i>E.coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal λ</i> (DE3)

2.1.5 Verwendete Pflanzenlinien

In dieser Arbeit wurden *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col-0) verwendet. Die T-DNA-Insertionslinien *cpk21-1* und *cpk23-1* waren im Col-0-Hintergrund. Des Weiteren wurde eine Komplementationslinie *pCPK21::CPK21* im *cpk21-1*-genomischen Hintergrund verwendet.

Tabelle 2–4: Verwendete Pflanzenlinien

Pflanzen -linien	Bezeichnung	Hintergrund	Insertionsort (Gen)	Mutagen	Referenz	
SALK_029412	<i>cpk21-1</i>	Col-0	<i>CPK21</i>	T-DNA	Alonso et al. (2003)	
SALK_007958	<i>cpk23-1</i>	Col-0	<i>CPK23</i>	pBIN- pROK2- Insertions- sequenz		
			Insert			
Pflanzen -linien	Bezeichnung	Hintergrund	Konstrukt	Promoter	Resistenz	Referenz
<i>pCPK21::CPK21</i>	<i>Komp.</i>	<i>cpk21-1</i>	pXCS-HA- Strep-II- <i>CPK21</i>	<i>pCPK21</i>	Phosphino- tricin	Franz et al. (2011)

2.1.6 Vektoren und Plasmide

Tabelle 2–5: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Antibiotika-Resistenz in <i>E. coli</i>	Merkmal	Unternehmen/Referenz
pJET1.2/blunt	Ampicillin	Vektor zur Klonierung von PCR-Fragmenten.	Fermentas (St. Leon-Rot)
pXCSG-Strep-II	Ampicillin	Gateway [®] -Expressionsvektor für C-terminal-markierte Strep-II-Fusionsproteine zur binären Expression. Das Strep-II-Fusionsprotein ist unter der transkriptionellen Kontrolle des Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promoters (35S-Promoters).	Witte et al. (2004)
pXCS-HA-Strep-II	Ampicillin	Binärer Expressionsvektor für C-terminal-markierte Hämagglutinin- (HA-) Strep-II-Fusionsproteine Das Fusionsprotein ist unter der transkriptionellen Kontrolle des 35S-Promoters.	Witte et al. (2004)
pXCS-YFP	Ampicillin	Expressionsvektor für C-terminal-„ <u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein“- (YFP-) markierte Fusionsproteine unter der transkriptionellen Kontrolle des 35S-Promoters.	Feys et al. (2005)
pET30a(+)	Kanamycin	Vektor zur Expression rekombinanter Proteine mit einem N-terminalen Sechshistidin- (His-) und S-Epitop-Tag in <i>E. coli</i> ; optional aber in dieser Arbeit nicht verwendet, eine C-terminale Histidin-Markierung. Das His-Tag kann mittels Thrombin entfernt werden. Das Fusionsprotein ist unter der transkriptionellen Kontrolle des <i>T7</i> -Promoters.	Novagen (Darmstadt)

Fortsetzung Tabelle 2–5

Bezeichnung	Antibiotika-Resistenz in <i>E. coli</i>	Merkmal	Unternehmen/Referenz
pGEX-6P1-5V/His	Ampicillin	Userexpressionsvektor für N-terminal GST- sowie C-terminalen Zehn-Histidin- (His-) und V5-markierte Fusionsproteine in <i>E. coli</i> . Das Fusionsprotein ist unter der transkriptionellen Kontrolle des <i>tac</i> -Promoters. <i>Tac</i> -Promoter beschrieben von de Boer et al. (1983).	zur Verfügung gestellt von Dr. Dietmar Geiger (AG Prof. Dr. Rainer Hedrich)

Tabelle 2–6: Plasmide zur Proteinexpression in *E. coli*.

Bezeichnung	Beschreibung	Hergestellt/Referenz
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i>	Expressionsvektor zur Herstellung rekombinanter N-terminaler His- und S-Tag-markierter <i>CPK21-CLD</i> -Varianten (Wildtyp und EF-Hand-Varianten mit degenerierten EF-Hand-Motiven)	in dieser Arbeit
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i> Δ EF1		
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i> Δ EF2		
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i> Δ EF1/2	Die <i>CPK21-CLD</i> umfasste die codierende Sequenz (CDS) von Basenpaar 1120–1596.	
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i> Δ EF3		
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i> Δ EF4		
pET30a (+) <i>CPK21-CLD</i> Δ EF3/4		

Fortsetzung Tabelle 2–6

Bezeichnung	Beschreibung	Hergestellt/ Referenz
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23D193A</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF1</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF2</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF1/2</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF3</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF4</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF3/4</i> pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23Q393E</i>	Expressionsvektor für CPK23-CDS ohne Stopcodon (einschließlich Varianten mit mutierten EF-Hand-Motiven und einer kinaseinaktiven Variante [D193A]) zur Herstellung rekombinanter Enzyme in <i>E. coli</i> . Die Fusionsproteine enthalten eine N-terminale GST- und V5-Markierung sowie eine C-terminale His-Markierung.	Der Vektor pGEX-6P1 5V/His-CPK23 wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Dietmar Geiger (AG Prof. Dr. Rainer Hedrich). Die restlichen Konstrukte wurden unter meiner Betreuung von einer Masterstudentin (Klara Altintoprak) hergestellt.
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23S362I</i>	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor für CPK23S362I (Punktmutante im Pseudosubstratsegment), siehe Zeile darüber.	in dieser Arbeit im
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23::21-CLD</i>	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor für die CPK23::21-CLD-Chimäre (CDPK23-CDS von Basenpaar 1–1087 und CPK21-CDS von Basenpaar 1120–1593); siehe oben.	zur Verfügung gestellt von Dr. Dietmar Geiger (AG Prof. Dr. Rainer Hedrich)
pGEX-6P1 5V/His CPK23::21-CLD-S362I	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor für das CPK23::21-CLD-S362I (Punktmutante im Pseudosubstratsegment der CPK23::21-CLD); siehe oben.	in dieser Arbeit
pGEX-6P1 5V/His NT-SLAC1	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor für den N-Terminus (CDS von Basenpaar 1–558) von <i>SLAC1</i> ; siehe oben.	zur Verfügung gestellt von Dr. Dietmar Geiger (AG Prof. Dr. Rainer Hedrich)

Tabelle 2–7: Plasmide für Untersuchungen in *A. thaliana*-Protoplasten.

Bezeichnung	Beschreibung	Hergestellt/Referenz
pXCS-HA-Strep-II <i>CPK21</i>	Binärer Expressionsvektor für die CDS der <i>CPK21</i> (einschließlich einer kinaseinaktiven Variante [D204A] und einer konstitutiv aktiven CPK-Variante [CPK21vk]). Die CPK21vk umfasste die <i>CPK21</i> -CDS von Basenpaar 1–1114; Varianten mit C-terminaler HA- und Strep-II-Markierung unter Kontrolle des 35S-Promoters.	AG Prof. Dr. Tina Romeis
pXCS-HA-Strep-II <i>CPK21D204A</i>		
pXCS-HA-Strep-II <i>CPK21vk</i>		
pXCS-HA-Strep-II <i>CPK21vkD204A</i>		
pXCS-HA-Strep-II <i>CPK23</i>	Binärer Expressionsvektor mit der CDS ohne Stopcodon der <i>CPK23</i> ; siehe oben.	in dieser Arbeit
pXCS-HA-Strep-II Ler <i>CDPK</i>	Binärer Expressionsvektor mit der CDS ohne Stopcodon einer zur <i>CPK23</i> homologen Landsberg erecta Ler <i>CDPK</i> ; siehe oben.	zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Dr. Erwin Grill
pXCS-HA-Strep-II <i>OST1</i>	Binärer Expressionsvektor mit der CDS ohne Stopcodon von <i>OST1</i> ; siehe oben.	AG Prof. Dr. Tina Romeis
pXCG-Strep-II <i>CPK23</i>	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor mit der CDS der <i>CPK23</i> (einschließlich einer kinaseinaktiven Variante [D193A]) und C-terminaler Strep-II-Markierung. Das Fusionsprotein steht unter der transkriptionellen Kontrolle des 35S-Promoters.	Dissertation Sandra Franz (2008)
pXCG-Strep-II <i>CPK23D193A</i>		
pXCS-YFP NT-SLAC1	Expressionsvektor mit dem N-Terminus (CDS von Basenpaar 1–558) und C-Terminus (CDS von Basenpaar 1486–1668) von <i>SLAC1</i> und C-terminale YFP-Markierung unter Kontrolle des 35S-Promoters.	in dieser Arbeit
pXCS-YFP		
CT-SLAC1		
pXCS-HA-Strep-II <i>NT-SLAH3</i>	Expressionsvektor mit dem N-Terminus von <i>SLAH3</i> (CDS von Basenpaar 1–457); siehe oben.	AG Prof. Dr. Tina Romeis

Fortsetzung Tabelle 2–7

Bezeichnung	Beschreibung	Hergestellt/Referenz
pBI221-GFP <i>ABI2</i>	Expressionsvektor mit <i>ABI2</i> (genomischen Sequenz von Basenpaar 486-2069) und N-terminaler GFP-Markierung unter Kontrolle des 35S-Promoters (Ampicillin-Resistenz).	zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Dr. Erwin Grill
pBI221- p35S::RCAR1	Expressionsvektor mit der CDS von <i>RCAR1</i> unter Kontrolle des 35S-Promoters (Ampicillin-Resistenz).	Ma et al.(2009)
pRD29B::LUC	Luciferase-Expressionsvektor unter der transkriptionellen Kontrolle des <i>RD29B</i> -Promoters; Basenpaare -1,771 bis -25 (Ampicillin-Resistenz).	Christmann et al. (2005)
pAHC27- <i>pUbi::GUS</i>	β -Glucuronidas- (GUS-) Expressionsvektor unter der transkriptionellen Kontrolle des <i>Ubiquitin- (Ubi1-)</i> Promoters aus Mais (Ampicillin-Resistenz).	Christensen und Quail (1996)

2.1.7 Verwendete Programme

Die statistische Analyse des Wachstumsversuchs auf Mannitol erfolgte mit „IBM SPSS Statistics 20 (IBM, USA). Sequenzdaten wurden mit „Vektor NTI“ (Invitrogen, Karlsruhe) ausgewertet. Die Datenauswertung der „Surface Plasmon Resonance“- (SPR-) Interaktionsstudien erfolgte mit „BIAevaluation Software“ (GE-Healthcare, Solingen).

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit *A. thaliana*-Pflanzen

2.2.1.1 Anzucht und Selektion von *A. thaliana*-Pflanzen

Die Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte bei 22 °C, 100 $\mu\text{mol Photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 Stunden Fotoperiode und 30 % Luftfeuchtigkeit. Für die abiotische Stress- und ABA-abhängigen Markergen-Expressionsstudien wurde *A. thaliana* auf 1-MS-Medium (pH 5,7) mit 3 % (w/v) Saccharose und 0,8 % (w/v) Pflanzenagar angezogen. Die Anzucht auf Erde erfolgte auf Mischerde, 42,42 % (w/w) Einheitserde P, 42,42 % (w/w) Einheitserde T und 15,16 % (w/w) Perligran (Kausek, Mittenwalde). Pflanzen zur Protoplastierung (Abschnitt 2.2.5.5) wurden in der Phytokammer bei 22 °C, 100 $\mu\text{mol Photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, acht Stunden Fotoperiode und 30 % Luftfeuchtigkeit auf Jiffy7-Erde (Jiffy Products, Norwegen) angezogen. Um ein gleichmäßiges Keimungsverhalten zu gewährleisten, wurden die Samen unabhängig

von den Anzuchtbedingungen nach dem Aussähen für einen Stratifikationszeitraum von drei Tagen bei 4 °C inkubiert. Als Selektionsmarker wurde die Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) verwendet. Zur Selektion wurden Pflanzen auf 0,5-MS-Medium (pH 5,7) mit final 10 µg/ml Phosphinotricin und 0,8 % (w/v) Pflanzenagar angezogen.

2.2.1.2 *A. thaliana*-Samen-Sterilisierung

Bei der Anzucht auf MS-Agar-Platten wurden oberflächensterilisierte *A. thaliana*-Samen verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch zweiminütige Inkubation in 70 % (v/v) Ethanol und anschließend 15 Minuten in Sterilisationslösung. Anschließend wurden die Samen fünfmal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen. Final wurden die Samen entweder in steriler 0,1 % Agaroselösung aufgenommen oder auf sterilem Filterpapier getrocknet.

Sterilisationslösung
6 % (v/v) Natriumhypochlorid
0,1 % Tween 20

2.2.1.3 Stressversuche an *A. thaliana*-Keimlingen

Für die phänotypische Untersuchung wurden oberflächensterilisierte Samen (Abschnitt 2.2.1.2) der *cpk21-1*, Col-0 und der *pCPK21::CPK21* auf 1-MS-Medium (pH 5,7) 3 % Saccharose und 0,8 % Pflanzenagar ausgelegt und stratifiziert. Sieben Tage alte Keimlinge wurden auf 1-MS-Agar-Platten (pH 5,7) mit 3 % Saccharose und 0,8 % Pflanzenagar sowie zusätzlich 100 oder 200 mM NaCl bzw. 200 oder 300 mM Mannitol umgesetzt. Das osmotische Potenzial für NaCl oder Mannitol wurde mit der Van-'t-Hoff-Gleichung berechnet und betrug für 100 mM NaCl und 200 mM Mannitol ca. -0,49 MPa und für 150 mM NaCl oder 300 mM Mannitol ca. -0,75 MPa. Die Berechnung erfolgte ohne Berücksichtigung des auf allen Platten identischen MS-Mediums und der Saccharose. Des Weiteren wurden Keimlinge auf PEG-enthaltenden Platten mit einem PEG-abhängigen osmotischen Potenzial von -0,45 MPa und -0,95 MPa transferiert. Die Herstellung von PEG-Agar-Platten erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben. 18–25 Tage nach dem Umsetzen der Keimlinge wurde für 30–40 Pflanzen pro Linie das Maß der Chlorosenbildung in den Kategorien Grün, Grüngelb und Gelb ermittelt. Die Licht-, Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen waren, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.4 Herstellung von Polyethylenglycol- (PEG-) Platten nach (Verslues et al. 2006)

Da PEG die Polymerisation von Agar verhindert, erfolgte die Herstellung von PEG-Agar-Platten durch Überschichtung der festen MS-Agar-Platten mit einer PEG-haltigen Lösung.

MS-Agar-Platten (pH 5,7) mit 3 % (w/v) Saccharose und 1,5 % (w/v) Pflanzenagar wurden hergestellt. Dazu wurden 20 ml Medium pro Platte (Petrischalen, 94 × 16 mm, rund) verwendet.

Die PEG-haltige Lösung für ein osmotisches Potenzial von $-0,45$ MPa enthielt 1 MS, 3 % (w/v) Saccharose und 40 % (w/v) PEG-8000 oder 55 % (w/v) PEG-8000 für $-0,95$ MPa. Das angegebene osmotische Potenzial berücksichtigt nicht das auf allen Platten identische MS-Medium mit Saccharose. Die Sterilisation der PEG-haltigen Lösung erfolgte durch Sterilfiltration.

Die MS-Agar-Platten wurden mit 30 ml PEG-haltiger Lösung überschichtet. Die mit PEG überschichteten Platten wurden über 15 Stunden inkubiert, um eine Diffusion des PEGs in die MS-Agar-Platte zu ermöglichen. Nach der Abnahme der oberen flüssigen Schicht konnten die Platten sofort verwendet werden.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von *E. coli*

Die *E.coli*-Kulturen wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Abschnitt 2.1.6) angezogen. Die Antibiotika wurden mit einer finalen Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin verwendet. Für das Wachstum auf LB-Agar-Platten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten bei 37 °C über Nacht angezogen. Die Anzucht in Flüssigkultur erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) über 12–16 Stunden.

2.2.2.2 Hitzeschocktransformation chemokompetenter *E.coli*-Zellen (DH10B/BL21 DE3)

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl gefrorene chemokompetente Zellen fünf Minuten auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Bakterien wurde die zu transformierende Plasmid-DNA (Konzentration: 20–100 ng, Volumen: 1–2 µl) zugegeben und der Ansatz vorsichtig vermengt. Anschließend inkubierten die kompetenten Zellen fünf Minuten auf Eis. Darauf folgte ein 45 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C. Der Transformationsansatz ruhte danach zwei Minuten auf Eis und wurde im Anschluss mit 500-µl-LB-Medium komplettiert. Die Bakterien inkubierten nach der Transformation über eine Stunde unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.2.3 Herstellung chemokompetenter *E.coli*-Zellen (DH10B/BL21 DE3)

200-ml-CR-Medium wurde mit 5-ml-LB-Übernachtskultur angeimpft. Die CR-Kultur wurde in einem Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen. Die Bakterien wurden zehn Minuten bei 2000 × g und 4 °C abzentrifugiert. Die weitere Handhabung erfolgte bei 4 °C. Die sedimentierten Bakterien wurden in 60 ml Transformationspuffer I aufgenommen und unter denselben Bedingungen wie oben erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Bakterienpellets in 8 ml Transformationspuffer II. Jeweils 100 µl Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

CR-Medium	Transformationspuffer I	Transformationspuffer II
2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton	30 mM Kaliumacetat	10 mM MOPS
0,5 % (w/v) Hefeextrakt	50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl ₂
0,5 % (w/v) MgSO ₄	100 mM RbCl ₂	75 mM CaCl ₂
10 mM KCl	10 mM CaCl ₂	15 % (v/v) Glycerin
	15 % (v/v) Glycerin	pH 6,5 (eingestellt mit 1 M NaOH)
	pH 5,8 (eingestellt mit Essigsäure)	sterilfiltriert
	sterilfiltriert	

2.2.3 Molekularbiologische Methoden – Nukleinsäuren

2.2.3.1 *E.coli*-Plasmid-DNA-Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „GenJet[®] Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben.

2.2.3.2 *E.coli*-Plasmid-DNA-Maxipräparation

Die Plasmid-DNA für die Protoplastentransfektion wurde nach Herstellerangaben mit dem „Plasmid Midi Kit“ (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in bidestilliertem Wasser mit einer finalen Konzentration von ca. 2 µg/µl gelöst.

2.2.3.3 DNA-Isolierung aus *A. thaliana* nach (Edwards et al. 1991)

Genomische DNA wurde aus *A. thaliana* nach der Edwards-Methode isoliert. Ein gefrorenes Blatt wurde in 200 µl Edwards-Puffer in einer Retschmühle mit 4–8 Stahlkugeln zwei Minuten bei 2000 Hz zerkleinert. Anschließend wurden 10 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung zugegeben und die unlöslichen Blattreste bei 10 000 × g drei Minuten abzentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 75 µl Isopropanol gemischt. Der Ansatz inkubierte über drei Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die ausgefällte DNA bei 10 000 × g zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation von fünf Minuten bei 10 000 × g wurde das Pellet

bei 42 °C getrocknet und final in 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Für einen 20-µl-Taq-PCR-Ansatz wurde 1 µl Edwards aufgereinigte DNA verwendet (Abschnitt 2.2.3.7).

Edwards-Puffer
200 mM TRIS-HCl (pH 7,5)
200 mM NaCl
25 mM EDTA

2.2.3.4 RNA-Isolierung aus *A. thaliana* mit der Trizol-Methode nach (Chomczynski und Sacchi 2006)

Gefrorenes Blattmaterial wurde im mit Stickstoff vorgekühlten Mörser zerkleinert. Circa 0,1 g zerkleinertes Pflanzenmaterial wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Trizol versetzt. Die Proben wurden eine Minute geschüttelt, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut eine Minute gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform, gefolgt von 20 Sekunden Mischen der Lösungen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugierten die Proben 15 Minuten bei 15 000 × g und 4 °C. Es kam zur Ausbildung einer organischen und einer wässrigen Phase. Die obere wässrige, RNA-enhaltende Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Die erneut durchgemischten Proben wurden bei 15 000 × g und 4 °C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das RNA-Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 15 000 × g und 4 °C wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und final in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.3.11 angegeben. Zur Qualitätsüberprüfung wurde 1 µg RNA mithilfe einer 1 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.2.3.8).

Trizol
0,8 M Guanidin-Thiocyanat
0,4 M Ammonium-Thiocyanat
0,1 M Natriumacetat
5 % (v/v) Glycerin
38 % (w/v) Phenol

2.2.3.5 DNase-Behandlung der RNA

Zu 1 µg RNA wurde 1 U RNase-freie DNase zugegeben und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Durch finale Zugabe von 2,5 mM EDTA und Inkubation über zehn Minuten bei 65 °C wurde die DNase irreversibel inaktiviert.

2.2.3.6 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte über 120 Minuten bei 42 °C mit 1 µg DNase-behandelter RNA (Abschnitt 2.2.3.5). Der 25-µl-Reaktionsansatz enthielt 50 mM TRIS-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM dNTP-Mix (0,5 mM je dNTP), 5 µg oligo(dT)-Oligonukleotide und 200 U MMLV, reverse Transkriptase M170. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz anschließend bei 72 °C 15 Minuten inkubiert. Die synthetisierte cDNA konnte sofort für die PCR (Abschnitt 2.2.3.7) verwendet werden. 1 µl cDNA wurde in einem 20-µl-Taq-PCR-Ansatz für die Genexpressionsanalysen verwendet. Zur Kontrolle der gleichen cDNA-Konzentrationen wurde *AKTIN2* genutzt.

2.2.3.7 Polymerase Chain Reaction (PCR) nach (Mullis et al. 1992)

Die PCR diente der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus pflanzlicher cDNA, genomischer DNA oder Plasmid-DNA. Dabei wird die hitzestabile DNA-Polymerase-Taq oder -Pfu verwendet. Die Spezifität des Amplifikats wurde durch Oligonukleotide (Primer) mit einer Länge von 20–27 Basenpaaren, die am 3'- und 5'-Ende des gewünschten Amplifikats binden, gewährleistet. Der 20-µl-Taq-PCR-Ansatz enthielt 2,5 U Taq-DNA-Polymerase, einmal „Green GoTag® Flexi Reaktionspuffer“ (Promega, Mannheim), 1,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP-Mix (0,25 mM je dNTP), 0,5 µM beider Oligonukleotide (0,25 µM je Oligonukleotid) und von der Anwendung abhängige variable Mengen Template. Der 20-µl-Pfu-PCR-Ansatz enthielt 2,5 U Pfu-Plus-DNA-Polymerase, einmal Pfu-Reaktionspuffer (Promega, Mannheim), 1 mM dNTP-Mix (0,25 mM je dNTP), 0,5 µM beider Oligonukleotide (0,25 µM je Oligonukleotid) und 20 µg Template.

In Tabelle 2-8 sind die Schritte eines PCR-Programms angegeben.

Tabelle 2–8: PCR-Programm.

Schritt	Temperatur		Zeit
1: Denaturierung	95 °C		3 min
2: Denaturierung	95 °C	Wiederholung Schritt 2–4 20–34-fach ^a	30 s
3: Primer-Bindung	55–60 ^b °C		30 s
4: Amplifikation	72 °C		1 min/1000 bp (Taq) 2 min/1000 bp (Pfu)
5: Amplifikation	72 °C		10 min

^{a, b} Temperatur der Primer-Bindung für die einzelnen Reaktionen in Anlage 1 bis 4 im Anhang aufgelistet.

2.2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente nach Größe aufgetrennt. Die verwendeten Agarosegele enthielten 1-2 % (w/v) Agarose, in TAE gelöst, und zur Anfärbung der DNA 1 % (v/v) Ethidiumbromid. Die DNA wurde mit einem fünftel Volumenanteil fünfmal DNA-Ladepuffer versetzt, und als Elektrophorespuffer wurde TAE verwendet. HyperLadder I[®] diente als Größenstandard. Abhängig von der Größe der Elektrophoresekammer lag eine Spannung zwischen 80 und 160 V an. Die DNA-Fragmente wurden unter Verwendung eines UV-Transilluminators ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

Lösungen:

TAE	5 × DNA-Ladepuffer
40 mM TRIS	50 % (v/v) Glycerin
0,1 mM EDTA	1 mM EDTA
pH 8,5 (eingestellt mit 28,55 % [v/v] Eisessig)	0,4 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.3.9 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Abschnitt 2.2.3.8) wurde der „High Pure PCR Cleanup micro Kit“ (Roche, Penzberg) verwendet. Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.10 Aufreinigung eines PCR-Produkts

Die Aufreinigung eines PCR-Produkts aus einen Reaktionsansatz (Abschnitt 2.2.3.7) erfolgte mit dem „High Pure PCR Cleanup micro Kit“ (Roche, Penzberg) nach Herstellerangaben.

2.2.3.11 Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Spektrofotometer (Nanodrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen). Die folgenden Formeln ermöglichten die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration.

dsDNA: $E_{260} = 1$ entspricht 50 mg/ml

RNA: $E_{260} = 1$ entspricht 40 mg/ml.

2.2.4 Klonierung

Ein schematischer Überblick über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide sind in den Tabellen 2-6 und 2-7 aufgelistet. Eine kurze schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Klonierungs-Strategien in den Tabellen 2-9, 2-10 und 2-11. Die Beschreibung der verwendeten Methoden in den Abschnitten 2.2.4.1-2.2.4.4.

Tabelle 2–9: Klonierungen in pXCS Vektoren.

Target Sequenz	Vektor	Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5`-3`) Restriktionsschnittstellen klein	Restriktions- schnittstellen	Bezeichnung kloniertes Plasmid
<i>CPK23</i> <i>cDNA</i>	pXCS- HA- Strep	CPK23fw	gaattcATGGGTTGTTTCAGCA GTAAAC	EcoRI	pXCS-HA- Strep-II- <i>CPK23</i>
		CPK23rw	cccgggGTGGAATGGATACTG TTTCCCT	SmaI	
<i>NT- SLAC1</i>	pXCS- YFP	SLAC1-NT fw	aagcttATGGAGAGGAAACAT CAGTCAAATGC	HindIII	pXCS-YFP- <i>NT-SLAC1</i>
		SLAC1-NT rw	cccgggTAGGAGAAACGGCC ATTGC	SmaI	
<i>CT- SLAC1</i>	pXCS- YFP	SLAC1-CT fw	aagcttATGCACGCCTTTGTCT GGC	HindIII	pXCS-YFP- <i>CT-SLAC1</i>
		SLAC1-CT rw	cccgggGTGATGCGACTCTTC CTCTGC	SmaI	

Tabelle 2–10: Klonierung in pET30a.

Target Sequenz	Vektor	PCR- Template DNA	Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5`-3`)	Restriktions- schnitt- stellen	Bezeichnung kloniertes Plasmid
<i>CPK21- CLD</i>	pET30 a (+)	pXCSG- StrepII- CPK21	cpk21 CLD frw	gatatcGCGGAGAG TCTATCAGAAGA GG	EcoRV	pET30a (+) <i>CPK21- CLD</i> ^a
			CPK 21 rw (mit STOP)	gaattcTCAATGGA ATGGAAGCAGTT TC	EcoRI	

^a Die Klonierung der Plasmide: pET30a (+) *CPK21-CLD ΔEF1*, pET30a (+) *CPK21-CLD ΔEF2*, pET30a (+), *CPK21-CLD ΔEF1/2*, pET30a (+) *CPK21-CLD ΔEF3*, pET30a (+) *CPK21-CLD ΔEF4*, pET30a (+) *CPK21-CLD ΔEF3/4* erfolgte analog zu pET30a (+) *CPK21-CLD* als Template wurde die entsprechende EF-Hand Mutante im pXCSG-StrepII verwendet. Beschreibung von pXCSG-StrepII-CPK21 *ΔEF1*, pXCSG-StrepII-CPK21 *ΔEF2*, pXCSG-StrepII-CPK21 *ΔEF1/2*, pXCSG-StrepII-CPK21 *ΔEF3*, pXCSG-StrepII-CPK21 *ΔEF4*, pXCSG-StrepII-CPK21 *ΔEF3/4* in Franz et al. (2011).

Die Klonierung der CPK23-Mutanten im Vektor pGEX-6P1 5V/His erfolgte über Mutagenese-PCR. Die verwendeten Oligonukleotide und das Verwendete PCR-Template in Tabelle 2-11.

Tabelle 2–11: Klonierung der CPK23-Mutanten in pGEX-6P1 5V/His.

PCR- Template DNA	Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5'-3') (Mutation in große Buchstaben)	Bezeichnung kloniertes Plasmid
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23</i>	CPK23 Δ EF1 fw	gtttgcgaatatggCtaccGCtagaagcgggaca	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF1</i>
	CPK23 Δ EF1 rw	tgccccgcttctaGCggtaGccatattcgcaaac	
	CPK23 Δ EF2 fw	tgaagcgtctgCtgtggCtggaatggaacaa	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF2</i>
	CPK23 Δ EF2 rw	ttgtccattaccaGccacaGcagacgcttca	
	CPK23 Δ EF3 fw	cattccaacacttagCtaaagCcaaaaatgggcacata	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF3</i>
	CPK23 Δ EF3 rw	tatgtgccattttgGcttaGctaagtgttgaatg	
	CPK23 Δ EF4 fw	tatccgaagttgCcaccgCcaatgatggaaa	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF4</i>
	CPK23 Δ EF4 rw	ttccatcattgGcggtgGcaacttcggata	
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF1</i>	CPK23 Δ EF2 fw	tgaagcgtctgCtgtggCtggaatggaacaa	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF1/2</i>
	CPK23 Δ EF2 rw	ttgtccattaccaGccacaGcagacgcttca	
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF3</i>	CPK23 Δ EF4 fw	tatccgaagttgCcaccgCcaatgatggaaa	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23 ΔEF3/4</i>
	CPK23 Δ EF4 rw	ttccatcattgGcggtgGcaacttcggata	

Fortsetzung Tabelle 2–11

PCR- Template DNA	Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5'-3') (Mutation in große Buchstaben)	Bezeichnung kloniertes Plasmid
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23</i>	CPK23 Q393E fw	caatcacttatgaaGaactccaaactgg	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23Q393</i> <i>E</i>
	CPK23 Q393E rw	ccagtttgaggtCttcataagtgattg	
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23</i>	CPK23 S362I fw	gccctaaaggtaTcgcggtgagtctatc	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23S362I</i>
	CPK23S362I rw	gatagactcaccgcgAtaaccttagggc	
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23</i>	D193Afw	gttgattcatcgagCtctcaagcctgag	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23D193</i> <i>A</i>
	D193A rw	ctcaggcttgagaGctcgatgaatcacac	
pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23::21</i> <i>-CLD</i>	CPK23 S362I fw	gccctaaaggtaTcgcggtgagtctatc	pGEX-6P1 5V/His <i>CPK23::21-</i> <i>CLDS362I</i>
	CPK23 S362I fw	gatagactcaccgcgAtaaccttagggc	

2.2.4.1 Restriktionsverdau von Plasmiden

Das Schneiden der Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Die Enzyme wurden in einem dazugehörigen Puffer nach Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die in 20 µl Reaktionsansatz verwendete Plasmid-DNA-Menge betrug zwischen 300 und 1000 ng. Der Ansatz inkubierte eine Stunde bei 37 °C, und anschließend wurde die Enzymaktivität durch zehn Minuten bei 70 °C inaktiviert.

2.2.4.2 Dephosphorylierung

Bei Klonierungen mit kompatiblen Enden im Vektor wurden, um die Selbstligation zu verhindern, die 5'-Enden des geschnittenen, über Gelelektrophorese isolierten Plasmids dephosphoryliert. Der Vektor inkubierte nach Zugabe von 1 U Rapid-Alkaline-Phosphatase

(RAP) und des RAP-Reaktionspuffers (final einmal) (Roche, Penzberg) 30 Minuten bei 37 °C. Durch Inkubation der Proben über zwei Minuten bei 75 °C wurde die RAP inaktiviert.

2.2.4.3 Ligation

Der 20- μ l-Ligationsansatz enthielt einmal Ligasepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot), T4-DNA-Ligase sowie Vektor und Insert. Das Molareverhältnis von Vektor zu Insert betrug 3 : 1, und es wurden zwischen 20 und 50 ng Vektor eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei 22 °C.

2.2.4.4 Mutagenese-PCR nach (Weiner et al. 1994)

In dieser Arbeit wurde wiederholt mit Punktmutanten unterschiedlicher CDPK-Varianten gearbeitet. Die Oligonukleotide zur Einführung der Mutation binden direkt an der zu mutagenisierenden Stelle. Die Mutagenese-Oligonukleotide sind ca. 30 Basenpaare lang, und die zum Template auftretende Falschpaarung befindet sich in der Mitte des Oligonukleotids. Der 50- μ l-Pfu-PCR-Ansatz enthielt 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase, einmal Pfu-Reaktionspuffer (Promega, Mannheim), 0,48 mM dNTP-Mix (0,12 je dNTP), 0,5 μ M beider Oligonukleotide (0,25 μ M je Oligonukleotid) und 20 μ g Template. Das Programm für die Mutagenese-PCR ist in Tabelle 2-12 dargestellt.

Tabelle 2–12: Mutagenese-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur		Zeit
1: Denaturierung	95 °C		3 min
2: Denaturierung	95 °C	Wiederholung Schritt 2–4 18-fach ^a	30 s
3: Primer-Bindung	60 °C		30 s
4: Amplifikation	68 °C		1 min/1000 bp
5: Amplifikation	68 °C		10 min

Durch Restriktionsverdau mit DpnI, das nur methylierte DNA schneidet, konnte die aus *E. coli* stammende Plasmid-DNA ohne Mutation spezifisch abgebaut werden. Die DNA wurde mit 10 U DpnI über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 3 μ l des DpnI-behandelten PCR-Ansatzes wurden in *E.coli*-Zellen transformiert (Abschnitt 2.2.2.2).

2.2.4.5 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung von 30–100 ng Plasmid-DNA oder ca. 10 ng PCR-Produkt erfolgte bei GATC (Konstanz).

2.2.5 Molekulare Methoden – Protein

2.2.5.1 Proteinexpression in *E. coli* unter Verwendung eines IPTG-induzierbaren Systems

Die Protein-Expressionsvektoren enthaltenden BL21- (DE3-) Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (siehe Tabellen 2-6 und 2-7) über Nacht bei 37 °C angezogen. Mit einer in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogenen Vorkultur wurde eine 100-ml- bzw. 200-ml-Hauptkultur (LB-Medium mit Antibiotika) auf eine OD₆₀₀ von 0,04 angeimpft. Die Hauptkultur inkubierte bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5–0,6. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe des synthetischen Laktose-Analogons IPTG mit einer finalen Konzentration von 1 mM. Die induzierte Kultur wurde bei 28 °C und 180 rpm drei Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000 × g und 4 °C 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Bakterienpellets wurden bei –20 °C gelagert oder direkt weiter bearbeitet.

Die Überexpression erfolgte in *E.coli*-BL21- (DE3-) Zellen mit zwei unterschiedlichen Vektorsystemen:

- I) Im pET30a-Vektor steht das Zielprotein unter der transkriptionellen Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promoters (siehe Tabelle 2-6). BL21- (DE3-) Zellen enthalten eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase unter der transkriptionellen Kontrolle eines Lac-UV5-Promoters. Die T7-RNA-Polymerase-Transkription kann durch Laktose und dessen synthetisches Analogon IPTG induziert werden. Die gebildete T7-RNA-Polymerase induziert die Zielprotein-Expression.
- II) In den Konstrukten des pGEX-6P1-User-V5-Vektors steht das Zielprotein unter der transkriptionellen Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promoters (siehe Tabelle 2-6). Die Transkription des Zielproteins wird durch IPTG direkt induziert.

2.2.5.2 Zellaufschluss von *E. coli*

Der Zellaufschluss von *E. coli* erfolgte in 1 ml Lysepuffer pro 20 ml IPTG-induzierte Kultur (Abschnitt 2.2.5.1). Das gefrorene Zellpellet wurde im Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden 0,02 g Lysozym zugegeben, und die Proben inkubierten über 15 Minuten bei Raumtemperatur: Die Zellen wurden dreimal für zehn Sekunden auf Eis bei Stufe 2–3 sonifiziert („Branson Sonifier“[®], G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd), und

anschließend wurden die löslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 × g von den unlöslichen getrennt. Der Lysepuffer unterschied sich je nach der weiteren Aufreinigungsstrategie.

GST-Lysepuffer für GST-Aufreinigung	His-Lysepuffer für His-Aufreinigung
50 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)
250 mM NaCl	300 mM NaCl
1 mM EDTA	30 mM Imidazol
0,2 % (v/v) TritonX-100	
1 mM DTT	
1 : 200 Protease-Inhibitor-Mix für <i>E.coli</i> -Zellextrakt (Sigma Produktnummer P8849)	

Anmerkung: Da sich die CPK21-CLDΔEF1 und CPK21-CLDΔEF2 sowie CPK21-CLDΔEF1/2 in den unlöslichen „Inclusions Bodies“ befanden, wurden die Proteine durch His-Lysepuffer mit 6 M Urea in die lösliche Proteinfraction überführt. Durch eine schrittweise Reduzierung des Harnstoffgehalts bei der His-Aufreinigung sollte die Rückfaltung ermöglicht werden (Abschnitt 2.2.5.4.1). Da in den SPR-Interaktionsanalysen kein Unterschied zwischen mit und ohne Urea aufgereinigter CPK21-CLD gemessen werden konnte, wird von einer korrekten Rückfaltung des Proteins ausgegangen (Daten nicht gezeigt).

2.2.5.3 GST-Aufreinigung

Die GST-markierten Proteine wurden über Affinitätschromatografie mit „GST•Bind Resin“ (Novagen, Darmstadt) aufgereinigt. Für 1 ml Zelllysate (Abschnitt 2.2.5.2) wurden 150 µl „GST•Bind Resin“ (50 % Suspension im GST-Lysepuffer) verwendet. Der Ansatz inkubierte auf dem Rotationsrad mit 20 rpm über 60 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf leere „Bio Spin“-Säulen (Bio-Rad, München) überführt und mit 4 ml GST-Waschpuffer 1 und 3 ml Waschpuffer 2 gewaschen. Dann wurde die GST-Matrix mit den gebundenen Proteinen in 1 ml GST-Waschpuffer aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die weitere Vorgehensweise unterschied sich entsprechend der anschließenden Kinaseaktivitätsmessung.

- I.) Die Messung der Aktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem ATP in das Peptid SLAC1.1. Die an die GST-Matrix gebundenen Proteine wurden bei 700 × g eine Minute sedimentiert und anschließend in 1 ml Puffer E aufgenommen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Final wurde die GST-Matrix in 150 µl Puffer E aufgenommen, und durch Auftrennung eines Aliquots über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung konnte eine grobe Anpassung der Proteinkonzentration erfolgen.

II.) Die Messung der Aktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem ATP in den N-Terminus von SLAC1. Die an die GST-Matrix gebundenen Proteine wurden bei 700 × g eine Minute sedimentiert und anschließend in 150 µl GST-Elutionspuffer aufgenommen. Die Proben inkubierten auf dem Rotationsrad mit 20 rpm zehn Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben erneut bei 700 × g eine Minute abzentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt, und alle Eluate wurden vereinigt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (Abschnitt 2.2.5.4.6) und durch Puffer-E-Zugabe angepasst.

GST-Lysepuffer	GST-Waschpuffer 1	GST-Waschpuffer 2
50 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	50 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	150 mM TRIS-HCl (pH 8,0)
250 mM NaCl	250 mM NaCl	250 mM NaCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM DTT
0,2 % (v/v) TritonX-100	0,2 % (v/v) TritonX-100	
1 mM DTT	1 mM DTT	
1 : 200 Protease-Inhibitor-Mix für <i>E.coli</i> -Zellextrak (Sigma Produktnummer P8849)		
GST-Elutionspuffer	Puffer E	
250 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	50 mM HEPES (pH 7,4)	
100 mM L-Glutathion, reduziert	2 mM DTT	
	0,1 mM EDTA	

2.2.5.4 Aufreinigung der CPK21-CLD für „Surface Plasma Resonance“- (SPR-) Interaktionsanalysen

Die SPR-Interaktionsanalysen erfolgten mit aufgereinigten CPK21-CLD-Varianten, die ein hohes Maß an Reinheit und eine Proteinkonzentration von 10 mM aufwiesen. In Tabelle 2-13 findet sich eine Übersicht über die einzelnen Schritte.

Tabelle 2–13: Schema der Aufreinigung für SPR-Interaktionsanalysen.

Schritt	Abschnitt der beschreibenden Methode
Proteinexpression in <i>E. coli</i> unter Verwendung eines IPTG-induzierbaren Systems	2.2.5.1
Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	2.2.5.2
Aufreinigung His-markierter Proteine	2.2.5.4.1
Entfernung der His-Markierung durch die Protease Thrombin	2.2.5.4.2
Erste Umpufferung über eine Entsalzungssäule	2.2.5.4.4
Phenylsepharose	2.2.5.4.3

Fortsetzung Tabelle 2–13

Schritt	Abschnitt der beschreibenden Methode
Zweite Umpufferung über eine Entsalzungssäule	2.2.5.4.4
Protein-Aufkonzentrierung Größenausschlussfiltration	durch 2.2.5.4.5

2.2.5.4.1 Aufreinigung His-markierter Proteine

Die poly-Histidin- (His-) markierten Proteine wurden über Affinitätschromatografie mit „Ni Sepharose 6 Fast Flow“[®] (GE-Healthcare, Solingen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben. Für 5 ml Zellysat (Abschnitt 2.2.5.2) wurden 500 µl „Ni Sepharose 6 Fast Flow“[®] (50 % Suspension im His-Lysepuffer) verwendet. Die Ni²⁺-Sepharose mit dem Zellysat inkubierte auf dem Rotationsrad mit 20 rpm über 60 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf leere „Bio Spin“-Säulen (Bio-Rad, München) überführt. Die „Ni²⁺-Sepharose“ wurde viermal mit 6 ml His-Lysepuffer und zweimal mit 4,5 ml His-Waschpuffer gewaschen.

Anmerkung: Bei Verwendung von His-Lysepuffer mit 6 M Urea wurde vor den weiteren Waschschritten jeweils mit 5 ml His-Lysepuffer mit in Ein-Molar-Schritten abnehmenden Urea-Konzentrationen von 5 M bis 0 M Urea gewaschen.

Die Elution erfolgte mit zweimal 1,5 ml His-Elutionspuffer.

His-Lysepuffer	His-Waschpuffer	His-Elutionspuffer
50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)	50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)	50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
30 mM Imidazol	50 mM Imidazol	250 mM Imidazol

2.2.5.4.2 Entfernung der His-Markierung durch die Protease Thrombin

Die His-eluierten Proteine wurden mit dem His-Elutionspuffer auf eine Proteinkonzentration von 1,6 mg/ml eingestellt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.5.4.6 beschrieben. Die Proben wurden anschließend 1 : 1 mit Thrombin-Reaktionspuffer gemischt, und 0,4 U Thrombin wurden zugegeben. Der Proteaseverdau erfolgte für 16 Stunden bei 20 °C.

Thrombin-Reaktionspuffer
20 mM HEPES (pH 8,4)
150 mM NaCl
2,5 mM CaCl ₂

2.2.5.4.3 Phenylsepharose

Die Aufreinigung über Phenylsepharose („HiTrap Phenyl FF“[®], GE-Healthcare, Solingen) erfolgte über hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC). Die Ca²⁺-gebundene CPK21-CLD bindet an die hydrophobe Oberfläche der Phenylsepharose. Durch hohe EGTA-Konzentrationen nimmt die CPK21-CLD die Ca²⁺-ungebundene Konformation an, was zur Elution von der Phenylsepharose-Säule führt. Die Equilibrierung der in 20 % (v/v) Ethanol gelagerten Säule erfolgte mit 5 ml H₂O und 10 ml HIC-Equilibrierungspuffer. Anschließend wurden 9 ml His-aufgereinigte und über die Entsalzungssäule in HIC-Equilibrierungspuffer umgepufferte Proben aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 ml HIC-Equilibrierungspuffer und 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die anschließende Elution erfolgte mit 1,5 ml HIC-Elutionspuffer. Alle Schritte erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min.

HIC-Equilibrierungspuffer	HIC-Waschpuffer	HIC-Elutionspuffer
10 mM HEPES (pH 7,5) 0,5 mM CaCl ₂ 150 mM NaCl	10 mM HEPES (pH 7,5) 10 mM EGTA	10 mM HEPES (pH 7,5) 50 mM EGTA

2.2.5.4.4 Umpufferung über eine Entsalzungssäule

Die Proben wurden im Rahmen der Aufreinigung zur SPR-Interaktionsstudie über eine Entsalzungssäule zweimal umgepuffert. Die unterschiedlichen Puffer sind unten aufgelistet. Zur Entsalzung wurde mit der Entsalzungssäule „Hi-Trap[®] Desalting“ (GE-Healthcare, Solingen) gearbeitet. Der als Probenpuffer bezeichnete Puffer ist der Probenpuffer nach Entsalzung. Nach fünfminütiger Equilibrierung der Säule mit dem gewünschten Probenpuffer wurde die Probe (1,5 ml) auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 2 ml Probenpuffer. Alle Schritte erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 4,8 ml/min.

Erste Entsalzung: Proben vor Entsalzung Thrombin-geschnittene, His-aufgereinigte Proben	Probenpuffer nach Entsalzung
	HIC-Equilibrierungspuffer 10 mM HEPES (pH 7,5) 0,5 mM CaCl ₂ 150 mM NaCl

Zweite Entsalzung: Proben vor Entsalzung über Phenylsepharose aufgereinigte Proben im HIC-Elutionspuffer	Probenpuffer nach Entsalzung
	SPR-Messpuffer 10 mM HEPES (pH 7,5)

2.2.5.4.5 Protein-Aufkonzentrierung durch Größenausschlussfiltration

Die Aufkonzentrierung der aufgereinigten CPK21-CLD-Varianten erfolgte mit „Centrifugal filter Devices“[®] (Merck, Darmstadt) mit einer 10-kDa-Membran (10 kDa Ausschlussgröße) nach Herstellerangaben.

2.2.5.4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem „Bio-Rad Protein Assay“[®] (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben. 10 µl einer „Albumin from bovine serum“- (BSA-) Standardreihe von 0,05–0,50 mg/ml und 10 µl unverdünnte sowie 1 : 4 bzw. 1 : 16 verdünnte Proben wurden mit 200 µl 1 : 5 verdünnte „Bio-Rad Protein Assay“[®]-Färbelösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nM bestimmt.

2.2.5.5 Transiente Protein-Expression in *A. thaliana*-Protoplasten

Zur Isolierung der Protoplasten wurde die bei Wu et al. (2009) beschriebene „Tape-Arabidopsis Sandwich“-Methode verwendet. Die Protoplastentransfektion erfolgte weitgehend, wie bei Yoo et al. (2007) beschrieben. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur.

Die neunten bis elften Rosetten-Blätter von vier Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit der Blattoberseite auf einem Klebefilm „Time tape“[®] (Time Med, USA) fixiert. Anschließend wurde die Blattunterseite mit einem Klebefilm „Magic tape“[®] (3 M, USA) bedeckt, sodass sich das Blatt in einem Sandwich zwischen zwei Klebefilmen befand. Durch Entfernen des „Magic tape“[®] wurde die Epidermis der Blattunterseite abgezogen. Sechs bis neun auf dem „Time tape“[®] fixierte Blätter ohne untere Epidermis inkubierten 60–90 Minuten unter leichtem Schütteln (40 rpm auf einem Horizontalschüttler) in 6 ml Enzymlösung.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 6 ml W5 abgestoppt. Nach Filtration durch einen Nylonfilter mit 80 µm Porengröße (Neolab, Heidelberg) wurden die Protoplasten durch Zentrifugation bei 100 × g eine Minute pelletiert. Das Zellpellet wurde in W5-Lösung resuspendiert und die Konzentration intakter Protoplasten in W5 auf $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Ermittlung der Protoplastendichte erfolgte mikroskopisch (×16) mithilfe einer Zählkammer. Die in W5 gelösten Protoplasten inkubierten 45 Minuten auf Eis. Nach 15 Minuten setzten sich die Protoplasten durch die Schwerkraft am Boden des Inkubationsgefäßes ab. Die sedimentierten Protoplasten wurden in MMG aufgenommen (Zelldichte: $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$). Pro Transfektion wurden 20 µg Gesamt-Plasmid-DNA, 100 µl Protoplastensuspension und 110 µl Transfektionslösung verwendet. Der Transfektionsansatz wurde nach sieben Minuten Inkubation durch Zugabe von 440 µl W5 abgestoppt und anschließend bei 100 × g eine Minute zentrifugiert. Die sedimentierten Protoplasten wurden in 1 ml WI aufgenommen. Die DNA-Mengenverteilung bei Kotransfektionen ist in Tabelle 2-14 angegeben.

Die Protoplasten inkubierten über Nacht in mit 5 % (v/v) Kälberserum beschichteten Petrischalen. Die Protoplasten wurden am Morgen durch Zentrifugation bei 10 000 × g fünf

Sekunden pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Protoplastenpellet kann direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

Tabelle 2–14: DNA-Mengenverteilung bei Kotransfektion unterschiedlicher Konstrukte pro Transfektionsansatz.

<i>pRD29B::LUC</i> - Expressionsmessungen		Co-IP-Interaktionsstudien		Untersuchung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung mit „ProQ [®] Diamond“	
<i>pRD29B::LUC</i>	7 µg	Interaktor 1 ^c	10 µg	SLAH3-NT	10 µg
CDPK ^a - Vektorkontrolle ^b	10 µg	Interaktor 2 ^a	10 µg	CDPK ^a	10 µg
<i>pAHC27-pUbi::GUS</i>	1 µg				
<i>pBI221- p35S::RCAR1</i>	2 µg				

^a CDPK-Varianten in den Vektoren *pXCSG-Strep-II* oder *pXCS-HA-Strep-II*.

^b Der entsprechende Leervektor.

^c *SLAC1-NT/SLAC1-CT* (Abschnitt 2.2.7.1) oder *ABI2/GFP* (Abschnitt 2.2.7.2).

Enzymlösung	W5	MMG	WI
20 mM MES (pH 5,7) ^a	2 mM MES (pH 5,7)	4 mM MES (pH 5,7)	4 mM MES (pH 5,7)
0,4 M Mannitol ^a	154 mM NaCl	0,4 M Mannitol	0,5 M Mannitol
20 mM KCl ^a	125 mM CaCl ₂	15 mM MgCl ₂	20 mM KCl
10 mM CaCl ₂ ^c	5 mM KCl		
1,5 % (w/v) Cellulase ^b			
0,4 % (w/v) Macerozym ^b			
0,1 % (w/v) BSA ^c			
^a Inkubation bei 72 °C, 2 min.	Transfektionslösung		
^b Inkubation bei 55 °C, 5 min.	30 % (w/v) PEG		
^c Zugabe bei Raumtemperatur.	0,2 M Mannitol		
	100 mM CaCl ₂		

2.2.5.6 *pRD29B::LUC*-Expressionsmessungen nach Yoo et al. (2007)

Der Protoplastenzellaufschluss erfolgte in 100 µl Lysepuffer pro Transfektionsansatz (Abschnitt 2.2.5.5). Die gefrorenen Zellpellets tauten im Lysepuffer unter Schütteln unter Verwendung eines Vortex auf.

Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde das Zellextrakt bei 1000 × g zwei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die zu untersuchenden Enzyme.

Zu 10 µl Überstand wurden 50 µl Luciferasesubstratmischung (Promega, Mannheim) zugegeben, und die Aktivität wurde sofort mit dem Luminometer gemessen.

Zur Transfektionskontrolle wurde die Menge gebildeter β-Glucuronidase bestimmt. 10 µl Überstand wurden mit 100 µl 4-Methylumbelliferyl-Glucuronid- (MUG-) Substrat-Mischung versetzt. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 0,9 ml 0,2-M-Na₂CO₃ abgestoppt. Mit einem Fluorometer konnte bei einer Anregungswellenlänge von 355 nM und einer Emissionswellenlänge von 460 nM die Menge des gebildeten Produkts Fluorophor (4-Methylumbelliferon) bestimmt werden.

Lysepuffer	MUG-Substrat-Mischung
5 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	10 mM TRIS-HCl (pH 8,0)
1 mM DTT	1 mM MUG
2 mM DACTAA	2 mM MgCl ₂
10 % (v/v) Glycerol	
1 % (v/v) Triton X-100	

Zum Nachweis der CDPK-Expression wurden sieben Zehntel des Überstands mit vier Volumenanteilen Extraktionspuffer versetzt und die Proteinaufreinigung wurde, wie in Abschnitt 2.2.5.7 beschrieben, durchgeführt.

2.2.5.7 Zellaufschluss von *A. thaliana*-Protoplasten und Strep-Affinitätschromatografie

Die Strep-Affinitätschromatografie erfolgte weitgehend, wie bei Witte et al. (2004) beschrieben. Der Protoplastenzellaufschluss erfolgte in 100 µl Extraktionspuffer pro Transfektionsansatz (Abschnitt 2.2.5.5). Die gefrorenen Zellpellets tauten im Extraktionspuffer unter Schütteln unter Verwendung eines Vortex auf. Das Zellextrakt wurde bei 20 000 × g und 4 °C zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Proteinexpressionsnachweis konnte der Überstand verwendet werden. Zur Anreicherung Strep-markierter Proteine wurde der Überstand mit 4 µl „Strep-Tactin Macroprep“ (50 % Suspension) (IBA, Göttingen) versetzt. Der Ansatz inkubierte auf dem Rotationsrad mit 20 rpm 45 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde die Probe bei 700 × g und 4 °C eine Minute zentrifugiert. Die sedimentierte Strep-Tactin-Matrix mit dem gebundenen Protein wurde in 500 µl Waschpuffer aufgenommen und erneut bei 700 × g eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Final wurde die

Strep-Tactin-Matrix in 1 × SDS-Probenpuffer aufgenommen, und durch Inkubieren von fünf Minuten bei 95 °C wurden alle an die Strep-Tactin-Matrix gebundenen Proteine in Lösung gebracht.

Extraktionspuffer	Waschpuffer	1 × SDS-Probenpuffer
100 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 5 mM EGTA 5 mM EDTA 100 mM NaCl 20 mM DTT 0,5 mM ABESF 1 : 200 Protease-Inhibitor-Mix (Sigma Produktnummer P9599) 2/2 µg/ml Aprotinin-Leupeptin-Mix 10 mM NaF 10 mM NaVO ₄ 10 mM β-Glycerolephosphate 0,5 % (v/v) Triton X-100 100 µg/ml Avidin	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 0,5 mM EDTA 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Triton X-100	60 mM TRIS-HCl (pH 6,8) 10 % Glyzin 2 % (w/v) SDS 100 mM DTT 0,004 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.5.8 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden 10–15 % Trenngele, entsprechend dem Molekulargewicht der untersuchten Proteine, und 5 % Sammelgele verwendet. Verwendet wurde das „Mini-SDS-Gel-System“ von Bio-Rad (München). Die Proben wurden mit 20 % 5 × SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend bei 95 °C fünf Minuten inkubiert. Als Puffer wurde Elektrophorese-Laufpuffer verwendet, und der „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ diente als Größenstandard. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und von 160 V im Trenngel.

5 × SDS-Probenpuffer	Elektrophorese-Laufpuffer
300 mM TRIS-HCl (pH 6,8) 50 % Glyzin 10 % (w/v) SDS 500 mM DTT 0,02 % (w/v) Bromphenolblau	50 M TRIS-HCl (pH 6,8) 10 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerol 1 M DTT

Trenngel	Sammelgel
10–15 % (v/v) Acrylamid/Bis 375 mM TRIS-HCl (pH 8,8) 0,05 % (v/v) Temed 0,075 % (w/v) APS	5 % (v/v) Acrylamid/Bis 125 mM TRIS-HCl (pH 6,8) 0,1 % (v/v) Temed 0,1 % (w/v) APS

Die weitere Analyse der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte durch deren direkte Färbung mit Coomassie- und „ProQ[®] Diamond“-Färbung (Abschnitte 2.2.5.9 und 2.2.5.10) oder durch Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Abschnitt 2.2.5.11). Bei den Untersuchungen des Ca²⁺-abhängigen Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel enthielt die mit SDS-Probenpuffer versetzte Probe final 1 mM CaCl₂ oder 5 mM EGTA.

2.2.5.9 Coomassie-Färbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung auf einem Horizontalschüttler bei 120 rpm. Anschließend wurden die Gele mehrere Stunden mit Entfärberlösung entfärbt.

Coomassie-Färbelösung	Entfärberlösung
0,1 % (w/v) Coomassie brillant-blau G-250 45,45 % (v/v) Methanol 10 % Eisessig	5 % (v/v) Methanol 9 % Eisessig

2.2.5.10 Färbungen „Sypro[®] Ruby“ und „ProQ[®] Diamond“

Über Strep-Affinitätschromatografie aufgereinigte Proteinproben wurden über ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel (NT-SLAC1) und ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel (CPK23-Varianten) aufgetrennt und mithilfe einer „ProQ[®] Diamond“-Phosphorprotein- und einer „Sypro[®] Ruby“-Protein-Gelfärbung nach Herstellerangaben (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) analysiert. Die Quantifizierung der Proteinphosphorylierung („ProQ[®] Diamond“) und Proteinmengen („Sypro[®] Ruby“) erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzbilder-Analysators (Fluorescent Image Analyzer FLA-2000G; Fujifilm Holdings Corp., Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm („ProQ[®] Diamond“) und von 473 nm („Sypro[®] Ruby“) sowie einem Breitband-Emissionsfilter von 580 nm

2.2.5.11 Western-Blot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond[™]-ECL[™]; GE-Healthcare, Solingen) erfolgte in dem „mini-PROTEAN R“-System (Bio-Rad, München). Das Gel und die Membran wurden beidseitig (von innen nach außen angegeben) von einem Whatman-Papier und einem Schwamm umschlossen. Der Transfer erfolgte über eine Stunde bei 100 V oder über 14 Stunden bei 40 V im Transferpuffer.

Transferpuffer
48 mM TRIS-HCl (pH 8,3) 40 mM Glyzin 20 % (v/v) Methanol

2.2.5.12 Immunodetektion

Der Nachweis der auf die Nitrocellulose-Membran transferierten Proteine erfolgte durch Antikörper. Die primären Antikörper banden spezifisch an die HA-, YFP- oder **G**reen **F**luorescent **P**rotein- (GFP-)Markierung des Fusionsproteins, wobei für GFP und YFP derselbe primäre Antikörper verwendet wurde. Die sekundären Antikörper banden spezifisch an die primären Antikörper. Die Detektion erfolgte mithilfe einer enzymatischen Reaktion der

an die sekundären Antikörper gebundenen Alkaline-Phosphatase (AP) oder der Meerrettichperoxidase (HRP). Die Detektion der Strep-markierten Fusionsproteine erfolgte über ein Strep-Tactin-AP-Konjugat: Auch wenn es sich hierbei nicht um eine Immunodetektion handelt, wird dieses Verfahren in diesem Abschnitt ebenfalls beschrieben. Eine schematische Übersicht über die Schritte der Immunodetektion ist in Tabelle 2-15 zusammengefasst.

Tabelle 2–15: Übersicht über die Arbeitsschritte der Immunodetektion.

Schritt	Dauer	Detektion Strep-Tactin-AP	Detektion Strep-Tactin-HRP	Detektion HA-AP	Detektion GFP-AP	Detektion GFP-HRP
Blockieren	60 min	10 ml 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T				
Waschen	3 × 10 min	3 × 30 ml TBS-T				
Blockieren	1 × 10 min	10 ml TBS-T 2 µg/ml Avidin		/	/	
Antikörper, primär	90 min	10 ml TBS-T 1 : 4000 Strep-Tactin-AP-Konjugat 2 µg/ml Avidin	10 ml TBS-T 1 : 4000 Strep-Tactin-HRP-Konjugat 2 µg/ml Avidin	10 ml TBS-T 1 : 2000 anti-HA IgG 1 % (w/v) Milchpulver	10 ml TBS-T 1 : 5000 anti-GFP IgG 1 % (w/v) Milchpulver	
Waschen	3 × 5 min	/	/	3 × 30 ml TBS-T		

Fortsetzung Tabelle 2-15

Schritt	Dauer	Detektion Strep-Tactin-AP	Detektion Strep-Tactin-HRP	Detektion HA-AP	Detektion GFP-AP	Detektion GFP-HRP	Detektion GFP-HRP
Antikörper sekundär	60 min	/	/	10 ml TBS-T 1 : 5000 anti-Rat IgG AP- Konjugat 1 % (w/v) Milchpulver	10 ml TBS-T 1 : 5000 anti-Maus IgG AP- Konjugat 1 % (w/v) Milchpulver	10 ml TBS-T 1 : 5000 anti-Maus IgG HRP- Konjugat 1 % (w/v) Milchpulver	10 ml TBS-T anti-Maus IgG HRP- Konjugat (w/v)
Waschen	3 x 5 min	2 x 30 ml TBS-T 1 x 30 ml TBS					
Detektion		10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) 66 µl NBT(50 mg/ml in 70% DMF).	SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)	10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) 66 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF).	10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) 66 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF).	SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)	

TBS	TBS-T	AP-Puffer
20 mM TRIS-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl	20 mM TRIS-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20	100 mM TRIS-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂

2.2.5.13 Färbung von Membranen mit dem Ponceaus-S-Farbstoff

Die Ponceau-S-Färbelösung wurde zum reversiblen Anfärben von Proteinen auf Blott-Membranen verwendet. Die Membran inkubierte unter leichtem Schwenken zehn Minuten in Ponceau-S-Färbelösung und wurde anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt.

Ponceau-S-Färbelösung
0,1 % (w/v) Ponceau-S 5 % Essigsäure

2.2.6 Enzymaktivitätsmessungen

2.2.6.1 Kinaseaktivitätsmessungen

Die Phosphorylierung des SLAC1.1-Peptids (RGPNRGKQRPFGRGFSRQVSL) wurde mit der P81-Filter-Binde-Methode, wie bei (Romeis et al. 2001) beschrieben, untersucht. Der 30- μ l-Reaktionsansatz enthielt 35 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM $MgCl_2$, 1,4 mM DTT, 0,07 mM EDTA, 10 μ M SLAC1.1, 1 μ M ATP, 3 μ Ci [γ - 32 P]-ATP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig), 5 mM EGTA und unterschiedliche Konzentrationen an $CaCl_2$. Die Berechnung der freien Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mittels der „WEBMXC extended“-Website (www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html). Für berechnete Konzentrationen an freiem Ca^{2+} von 0,20 μ M, 0,35 μ M und 4 μ M betrug die zugegebene $CaCl_2$ -Konzentration 3,25 mM, 3,8 mM bzw. 4,87 mM. Die Reaktion erfolgte über 15 Minuten bei 22 °C. Durch Zugabe von 3 μ l 10 % Phosphorsäure wurde die Reaktion abgestoppt, und 20 μ l Reaktionsansatz wurden auf P81-Filterpapier gegeben. Nachdem das P81-Filterpapier bei Raumtemperatur getrocknet war, wurde es dreimal mit 1 % Phosphorsäure gewaschen. Die Bestimmung der eingebauten 32 P-Konzentration erfolgte über Szintillationsflüssigkeit. Das P81-Filterpapier wurde mit 200 μ l Szintillationsflüssigkeit überschichtet und über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenz wurde im Szintillationszähler bestimmt.

Die Phosphorylierung des N-Terminus von SLAC1 erfolgte analog, außer dass 1 μ g NT-SLAC1 im 30 μ l Reaktionsansatz enthalten war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt, und 15 μ l Aliquots der Proben wurden über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abschnitt 2.2.5.8). Die Detektion der untersuchten Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung; das SDS-Polyacrylamidgel wurde vakuumgetrocknet. Der Nachweis der CDPK-Autophosphorylierung und der NT-SLAC1-Transphosphorylierung erfolgte über eine Phosphorimager-Platte (BAS-MS, Fujifilm Holdings Corp., Japan).

2.2.7 Interaktionsstudien

2.2.7.1 SLAC1-CPK23-Coimmunpräzipitationen

Die Protoplastentransfektion erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.5.5 beschrieben. Der Zellaufschluss erfolgte im Co-IP-Extraktionspuffer 1. Das Zellextrakt wurde bei 20 000 \times g und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, auch als „Input“ bezeichnet, diente der Expressionskontrolle des YFP-markierten Interaktionspartners. Zur Strep-Aufreinigung wurde der Überstand mit 5 μ l „Strep-Tactin Macrorep“ auf dem Rotationsrad mit 20 rpm bei

4 °C über 30 Minuten inkubiert. Die an die Strep-Tactin-Matrix gebundenen Proteine wurden fünfmal gewaschen: die Waschschrte 1–3 und 5 mit Co-IP-Waschpuffer 1 und der Waschschrte 4 mit Co-IP-Waschpuffer 2. Final wurde die Strep-Tactin-Matrix in 30 µl 2 × SDS-Probenpuffer aufgenommen, und durch Inkubieren von fünf Minuten bei 95 °C wurden alle an die Strep-Tactin-Matrix gebundenen Proteine in Lösung gebracht. Die Proben wurden über ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und der Proteinnachweis erfolgte mit Western-Blot und Immunodetektion (Abschnitte 2.2.5.11 und 2.2.5.12).

Co-IP-Extraktionspuffer 1	Co-IP-Waschpuffer 1	Co-IP-Waschpuffer 2
100 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0)	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0)
200 mM NaCl	200 mM NaCl	1 M NaCl
20 mM DTT	2 mM DTT	2 mM DTT
10 mM NaF	10 mM NaF	10 mM NaF
10 mM NaVO ₄	10 mM NaVO ₄	10 mM NaVO ₄
10 mM β-Glycerolephosphate	10 mM β-Glycerolephosphate	10 mM β-Glycerolephosphate
0,5 mM AEBSF	0,05 % (v/v) TritonX-100	0,05 % (v/v) TritonX-100
100 µg/ml Avidin		
1 : 200 PI-Mix		

2.2.7.2 LerCDPK-ABI2-Coimmunpräzipitationen

Die Protoplastentransfektion erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.5.5 beschrieben. Das Protoplastenpellet wurde in 300 µl Co-IP-Extraktionspuffer aufgeschlossen. Das Zellextrakt zentrifugierte acht Minuten bei 20 000 × g und 4 °C. Der Überstand (Input) diente der Expressionskontrolle des GFP-markierten Interaktionspartners. Zur Anreicherung der Strep-II-markierten Proteine wurde der Überstand mit 12 µl „Strep-Tactin Macroprep“ auf dem Rotationsrad mit 20 rpm 45 Minuten bei 4 °C inkubiert. Der Ansatz wurde fünfmal mit Ko-IP-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der an der Matrix gebundenen Proteine erfolgte zweimal in 50 µl Elutionspuffer. Dazu inkubierten die Proben auf dem Rotationsrad mit 20 rpm zehn Minuten bei Raumtemperatur. Die Proben wurden über ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und mit Western-Blot und Immunodetektion wurden die Proteine nachgewiesen (Abschnitte 2.2.5.11 und 2.2.5.12).

Co-IP-Extraktionspuffer	Co-IP-Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM HEPES (pH 7,4)	50 mM HEPES (pH 7,4)	50 mM HEPES (pH 7,4)
150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,1 % (v/v) NP-40	0,1 % (v/v) NP-40	0,1 % (v/v) NP-40
1 mM DTT		10 mM Biotin
100 µg/ml Avidin		
1 : 200 PI-Mix		

2.2.7.3 „Surface Plasmon Resonance“- (SPR-) Interaktionsstudien

Die Studien zur Interaktion zwischen der CPK21-CLD und dem CPK21-Pseudosubstratsegment-Peptid 21P1 (AMNKLKKLALKVI) erfolgten mit der SPR-Technologie unter Verwendung eines „Biacore 3000“-Geräts (GE-Healthcare, Solingen). Das Peptid 21P1 umfasst den letzten Teil des CPK21-Pseudosubstratsegments.

2.2.7.3.1 Immobilisierung des Peptids 21P1

Die Immobilisierung des Peptids 21P1 an der Oberfläche des Sensorchips „CH5“ (GE-Healthcare, Solingen) erfolgte über die Aminogruppe nach Johnsson et al. (1991). Der Sensorchip wurde erst durch die Injektion von 35 µl einer NHS/EDC-Mischung (0,1 M N-hydroxysuccinimide und 0,4 M 1-ethyl-3-[3-diethylaminopropyl-carbodiimide]) aktiviert; anschließend erfolgte die Injektion von 30 µl 21P1-Peptid (43 µg/ml) in 5 mM Natrium-Maleat (pH 6,5); gefolgt von der Deaktivierung der reaktiven Gruppen mit 1 M Ethanolamine-HCl (pH 8,5). Alle Immobilisierungsschritte erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min. Eine zweite Zelle wurde ohne Injektion des 21P1-Peptids entsprechend aktiviert und deaktiviert und diente als Leerzelle zur Hintergrundkorrektur.

2.2.7.3.2 Messung des SPR-Signals

Die Interaktionsstudien erfolgten bei 25 °C mit einer CPK21-CLD-Konzentration von 0,00–4,69 µM im Biacore-Interaktionspuffer mit 2 mM CaCl₂ oder 2 mM EGTA. Die Zugabe des CLD enthaltenden Biacore-Interaktionspuffers mit 2 mM CaCl₂ bzw. 2 mM EGTA erfolgte über 40 Sekunden bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 µl/min. Anschließend wurde mindestens fünf Minuten mit Biacore-Interaktionspuffer (Flussgeschwindigkeit: 20 µl/min) gewaschen.

Biacore-Interaktionspuffer
10 mM HEPES (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,005 % (v/v) Tween-20

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der *in vivo* Funktion der CPK21 und CPK23

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist, eine mögliche Funktion der CPK23 und CPK21 in der abiotischen Stressantwort und der damit verbundenen ABA-Signalweiterleitung zu untersuchen. Der erste Abschnitt dieser Untersuchung beschäftigt sich unter Berücksichtigung von Daten aus vorangegangenen Arbeiten mit der Charakterisierung einer möglichen Aufgabe der CPK21 und CPK23 in der abiotischen Stressantwort unter Verwendung von T-DNA-Insertionslinien. Durch diese Ergebnisse bestätigt, wird im Hauptteil der funktionellen Untersuchung der *in vivo* Funktion auf eine mögliche Funktion bei der ABA-Signalweiterleitung fokussiert. Diese Untersuchungen sind transient *in vivo*, im *A. thaliana*-Protoplasten-System, unter Einbeziehung unterschiedlicher Komponenten des ABA-Signalweges erfolgt.

3.1.1 Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien der CPK21 und CPK23

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten T-DNA-Insertionslinien der CPK21 und CPK23 wurden zunächst die genauen T-DNA-Insertionsorte bestimmt. Dies erlaubt, im Zusammenhang mit der RT-PCR-gestützten Analyse und dem Wissen um die funktionellen Domänen von CDPKs eine mögliche Funktionalität eines Resttranskripts zu beurteilen.

3.1.1.1 Bestimmung des T-DNA-Insertionsortes für die T-DNA-Linie mit Insertionsereignis in CPK21 (SALK_029412)

Aufgrund vorangegangener Untersuchungen der CPK21 war zu Beginn dieser Arbeit eine bereits isolierte homozygote T-DNA-Linie (SALK_029412) *cpk21-1* im *Col-0*-Hintergrund vorhanden (Alonso et al. 2003). Aufgrund der von der „Arabidopsis Information Resource“ (TAIR) zur Verfügung gestellten Sequenzierungsdaten wurde von einer Insertion im ersten Exon ausgegangen (www.arabidopsis.org, 28. Oktober 2011).

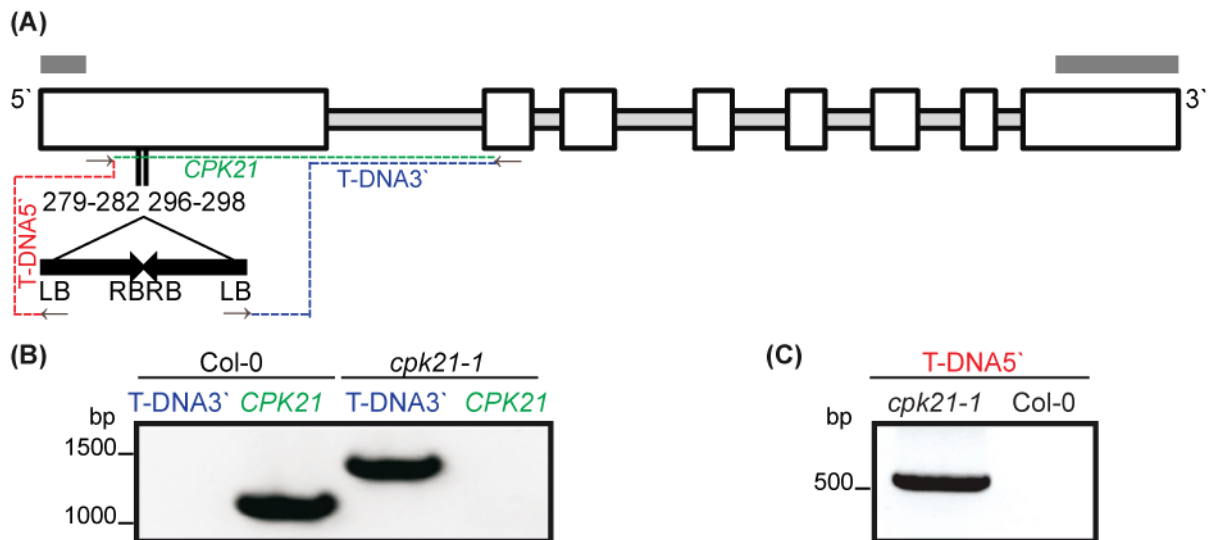


Abbildung 3–1: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie SALK_029412 *cpk21-1*.

(A) – Schema des *CPK21*-Genmodells (AT4G04720.1) mit genau bestimmter T-DNA-Insertionsstelle im ersten Exon (weiße Quadrate [Exons], hellgraue Quadrate [Introns] und dunkelgrauer Balken [untranslatierte UTR-Bereiche]). Die Festlegung der Intron-Exon-Grenzen erfolgt nach TAIR (www.arabidopsis.org, 28. Oktober 2011). Die *CPK21*-genomische Gesamtlänge beträgt 3302 Basenpaare (bp). Die eingezeichnete T-DNA-Insertion ist nicht maßstabgetreu angegeben. Beziffert sind die möglichen bp der genomischen *CPK21*-Sequenz, hinter denen das Insertionsereignis stattgefunden haben könnte. Braune Pfeile markieren die in (B) und (C) verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotid-Kombination der in (B) und (C) gezeigten PCR-Reaktionen sind durch gestrichelte Linien verbunden, wobei die gleiche Farbkodierung und -bezeichnung wie in (B) und (C) verwendet wurden. (B und C) – PCR-Analyse mit Oligonukleotiden, die strangoberhalb 5' und -unterhalb 3' der T-DNA binden. Verwendet wurden ein im „Left Border“- (LB-) Bereich der T-DNA bindendes Oligonukleotid, in Kombination mit einem Oligonukleotid im ersten Exon (C) oder zweiten Exon (B), und zum Nachweis des genomischen Fragments ein im ersten und zweiten Exon bindendes Oligonukleotid.

Genauer Mapping der Insertionsstelle erfolgte durch unterschiedliche Kombinationen von Oligonukleotiden, die strangoberhalb und -unterhalb der T-DNA binden, und ein T-DNA-spezifisches Oligonukleotid, das an der LB bindet (Abbildung 3-1, [B] und C)]. Dabei zeigt sich, dass die Insertion zwei LB besitzt. Daher wird für das Insert ein Aufbau von LB-RB-RB-LB angenommen. Diese Art von T-DNA-Insertion in SALK-Linien wurde bereits auf der SIGnAI-Website (<http://signal.salk.edu>) beschrieben. Die Analyse der die Insertionsstelle umgebenden Sequenzen führte zu zwei unterschiedlichen Insertionsorten, 279–282 bp und 296–298 bp; dies deutet auf eine Deletion von 17–19 bp der *CPK21*-Sequenz hin (Abbildung 3-1, [A]). In der Literatur wurden unter anderem genomische Deletionen in Pflanzen aufgrund von T-DNA-Insertionsereignissen in Tomate (*Solanum lycopersicum*), *A. thaliana*, Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Aspen (*Populus tremula*) beschrieben (Gheysen et al. 1987; Matsumoto et al. 1990; Mayerhofer et al. 1991; Kumar und Fladung 2002). Die Insertionsstellen konnten nicht auf ein bp festgelegt werden, da die *CPK21*-Sequenz und die Sequenzen an diesen Stellen für 3–4 bp übereinstimmen. Diese Sequenzgleichheit ist auch dadurch gegeben, dass beide LB der T-DNA Deletionen um 90 bis 110 bp aufweisen. Mayerhofer et al. (1991) konnten in *A. thaliana* zeigen, dass Deletionen im Zielgenom bei T-

DNA-Insertionsereignissen bei 5–7 identischen Nukleotiden zwischen den entsprechenden Bruchstellen der Zielgene und der verkürzten T-DNA auftraten. Vieles deutet im Fall der Linie *cpk21-1* auf ein den Beobachtungen von Mayerhofer ähnelndes Insertionsereignis hin. Diese Beobachtungen können durch die Annahme einer homologen Rekombination als Schritt der T-DNA-Insertion erklärt werden (Mayerhofer et al. 1991). Mit Oligonukleotiden, die strangunterhalb des T-DNA-Insertionsortes binden, konnte in semiquantitativen RT-PCR-Analysen kein *CPK21*-Transkript nachgewiesen werden (Abbildungen 3-5 und 3-6). Es wird angenommen, dass ein möglicherweise entstehendes Resttranskript die ersten 282 bp der genomischen *CPK21*-Sequenz umfasst. Diese 282 bp umfassen den translatierten Bereich der *CPK21*-Sequenz vom ATG (129 bp) bis zur T-DNA-Insertion und würden damit zu einem Peptid der 51 N-terminalen Aminosäuren-CPK21-Sequenz führen. Dieses Restpeptid umfasst einen Teil der N-terminalen variablen Domäne und kann weder als Kinase noch als Ca^{2+} -Bindeprotein funktionell sein.

3.1.1.2 Bestimmung des T-DNA-Insertionsortes für die T-DNA-Linie mit Insertionsereignis in *CPK23* (SALK_007958)

Wie für die *CPK21* war auch für die *CPK23* zu Beginn dieser Arbeit eine bereits isolierte homozygote T-DNA (SALK_007958) *cpk23-1* im *Col-0*-Hintergrund vorhanden (Alonso et al. 2003). Da die Insertionsstelle von Ma und Wu im siebten Intron beschrieben wurde, war zu Beginn der Untersuchung eine Insertion im siebten Intronbereich angenommen worden (Ma und Wu 2007). Der durch Mapping identifizierte Insertionsort lag im Bereich des siebten Exons (Abbildung 3-2, [A]). Dieser von Ma und Wu abweichende Insertionsort konnte mit strangoberhalb und -unterhalb bindenden Oligonukleotiden bestätigt werden.

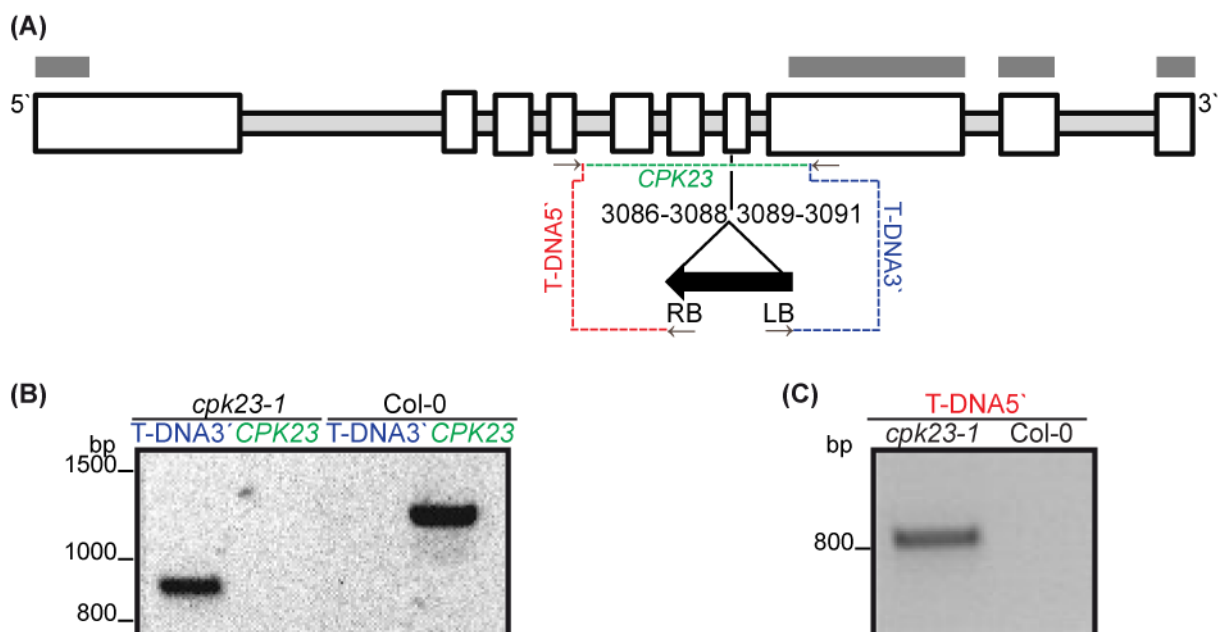


Abbildung 3–2: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie SALK_007958 *cpk23-1*.

(A) – Schema des *CPK23*-Genmodells (AT4G04740.1) mit genau bestimmter T-DNA-Insertionsstelle im siebten Exon (weiße Quadrate [Exons], hellgraue Quadrate [Introns] und dunkelgrauer Balken [untranslatierte UTR-Bereiche]). Die Festlegung der Intron-Exon-Grenzen erfolgt nach TAIR (www.arabidopsis.org, 1. November 2011). Die *CPK23*-genomische Gesamtlänge beträgt 5129 bp. Die eingezeichnete T-DNA-Insertion ist nicht maßstabgetreu angegeben. Beziffert sind die möglichen bp der *CPK23*, hinter denen das Insertionsereignis stattgefunden haben könnte. Braune Pfeile markieren die in (B) und (C) verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotid-Kombination der in (B) und (C) gezeigten PCR-Reaktionen sind durch gestrichelte Linien verbunden, wobei die gleiche Farbkodierung und -bezeichnung wie in (B) und (C) verwendet wurden. (B und C) – Die PCR-Analysen erfolgten mit einem strangoberhalb 5'-bindenden Oligonukleotid in Kombination mit einem im „Right Border“- (RB-) Bereich bindenden Oligonukleotid (C) und einem Oligonukleotid-Paar aus unterhalb 3' der T-DNA bindenden Oligonukleotid und einem im LB-Bereich der T-DNA bindenden Oligonukleotid (B). Zum Nachweis des *CPK23*-genomischen Fragments wurde ein im vierten und achten Exon bindendes Oligonukleotid genutzt.

Die Verwendung von im RB- und LB-Bereich bindenden Oligonukleotiden zeigte für das Insert eine inverse Leserichtung von RB nach LB (Abbildung 3-2). Auffällig ist, dass auch für die *CPK23* zwischen den Insertionsenden und der Zielensequenz jeweils an den Insertionssequenzen Sequenzgleichheiten von zwei Nukleotiden auftreten, die nur einmal in der entstehenden Chimäresequenz vorhanden sind. Genauer handelt es sich für die *CPK23* um die bp 3087–3088 und 3090–3091 (Abbildung 3-2, [A]). Diese Sequenzgleichheit ist auch dadurch gegeben, dass sowohl die RB als auch die LB der T-DNA Deletionen von ca. 70 bp (LB) bzw. ca. 110 bp (RB) aufweisen. In keiner der beiden *CPK23*-Sequenzen konnte das bp 3089 gefunden werden; dies ist vermutlich auf ein mit der Insertion zusammenhängendes Deletionsereignis zurückzuführen. Diese Beobachtungen lassen zur *cpk21-1*-Linie analoge Schlüsse (Abschnitt 3.1.1.1) zu und lassen sich entsprechend durch die Annahme einer homologen Rekombination als Schritt der T-DNA-Insertion erklären.

3.1.1.3 Untersuchungen eines Resttranskripts in der *cpk23-1*-Mutante

Für die *cpk23-1*-Mutante stellt sich aufgrund des Insertionsortes im siebten Exon die Frage nach dem Verlust der *CPK23*-Funktion. Im Folgenden wird analysiert, welche Bereiche der *CPK23*-mRNA in der *cpk23-1*-Mutante noch vorhanden sind.

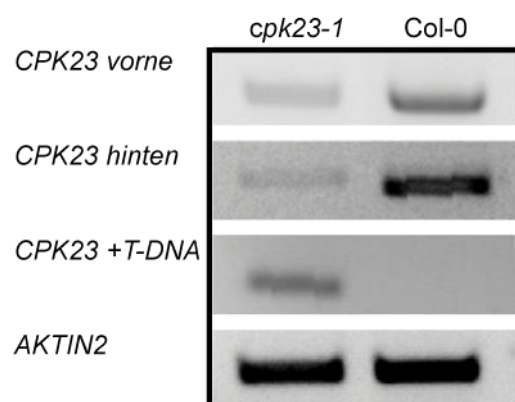


Abbildung 3–3: Untersuchung des *CPK23*-Transkripts in der *cpk23-1*-Mutante.

Semiquantitative RT-PCR-Analysen mit *CPK23*-Oligonukleotiden, die strangoberhalb (*CPK23, vorne*) und -unterhalb (*CPK23, hinten*) von der Insertionsstelle binden. In einer weiteren RT-PCR-Analyse wurde ein in der T-DNA bindendes RB-Oligonukleotid in Verbindung mit einem strangoberhalb bindenden Oligonukleotid (*CPK23+TDNA*) verwendet.

Strangoberhalb und -unterhalb der T-DNA liegende mRNA-Abschnitte konnten in der *cpk23-1* amplifiziert werden (Abbildung 3-3). Des Weiteren konnte ein *CPK23*-Transkript, das Teile der T-DNA enthält, in der *cpk23-1* nachgewiesen werden (Abbildung 3-3). Daher wird

angenommen, dass eine *CPK23*-mRNA einschließlich der T-DNA gebildet wird. Dieses Transkript kann aufgrund seiner Länge nicht unter den gewählten PCR-Bedingungen in der die T-DNA umfassenden RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 3-5). Das Amplifikat des 3' der Insertionsstelle liegenden mRNA-Abschnitts (*CPK23*, hinten) scheint in der *cpk23-1* schwächer als im Wildtyp exprimiert zu sein (Abbildung 3-3). Dieser Expressionsunterschied könnte durch einen teilweise auftretenden Transkriptionsabbruch vor der *CPK23*-Terminatorregion zustande kommen. Dieses vorzeitige Transkriptionsende könnte sich *in vivo* bei der RNA-Synthese ereignen. Der strangoberhalb des Insertionsortes amplifizierte mRNA-Abschnitt (*CPK23*, vorne) deutet auf eine im Vergleich zu Col-0 schwächere *CPK23*-Expression hin. Dieser Unterschied zwischen *cpk23-1* und Col-0 bei der *CPK23*-Transkription ist nicht so ausgeprägt wie für das strangunterhalb liegenden Amplifikat (*CPK23*, hinten). Der Expressionsunterschied für die *CPK23* vorne, könnte durch einen Template-längenbedingten teilweise auftretenden, Transkriptionsabbruch bei der c-DNA-Synthese *in vitro* entstehen. Ein Abbau der T-DNA enthaltenden *CPK23*-mRNA würde auch zu den beschriebenen Effekten führen. In der *cpk23-1*-T-DNA-Insertion ist nach vier Triplets ein Stopcodon im mRNA-Leserahmen vorhanden. Daher wird von einer *CPK23*-Protein-Variante ausgegangen, die sich aus dem 5' der Insertionsstelle liegenden kodierenden Bereich und vier aus der T-DNA stammenden Aminosäuren zusammensetzt. Im Hinblick auf die Proteinstruktur befindet sich der T-DNA-Insertionsort in der E-Helix der dritten EF-Hand. Die verkürzte *CPK23*-Kinase umfasst den N-Terminus und die Kinasedomäne, das Pseudosubstratsegment und das N-terminale EF-Hand-Paar. Somit kann eine Aktivität dieser postulierten verkürzten *CPK23*-Variante nicht ausgeschlossen werden. Bei der Betrachtung der verkürzten *CPK23*-Variante scheint eine veränderte Kinaseaktivität oder Ca^{2+} -Abhängigkeit möglich. Die Aktivität dieser angenommenen verkürzten *CPK23*-Variante wird im Zusammenhang mit einer phänotypischen Analyse und des CDPK Aktivierungsmodells diskutiert (siehe Diskussion, Abschnitt 4.2.1).

3.1.2 Phänotypische Untersuchung der *cpk21-1* unter hyperosmotischen Stressbedingungen

In der Dissertation von Sandra Franz konnte unter osmotischen Stressbedingungen eine erhöhte Stresstoleranz der *cpk21-1* beobachtet werden (Dissertation Sandra Franz 2008). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine detaillierte Untersuchung der osmotischen Stressresistenz der *cpk21-1* durch die Verwendung verschiedener Osmolyten im Anzuchtmedium. In diesen Untersuchungen wurde eine Komplementationslinie mit der genomischen *CPK21*-Sequenz unter der transkriptionellen Kontrolle des nativen Promoters im genetischen *cpk21-1*-Hintergrund einbezogen. Die phänotypischen Untersuchungen erfolgten durch Wachstumsversuche auf 1 MS mit 3 % Saccharose in Kombination mit 100

bzw. 150 mM NaCl, 200 bzw. 300 mM Mannitol oder PEG-Konzentrationen mit einem osmotischen Potenzial von $-0,45$ oder $-0,95$ MPa.

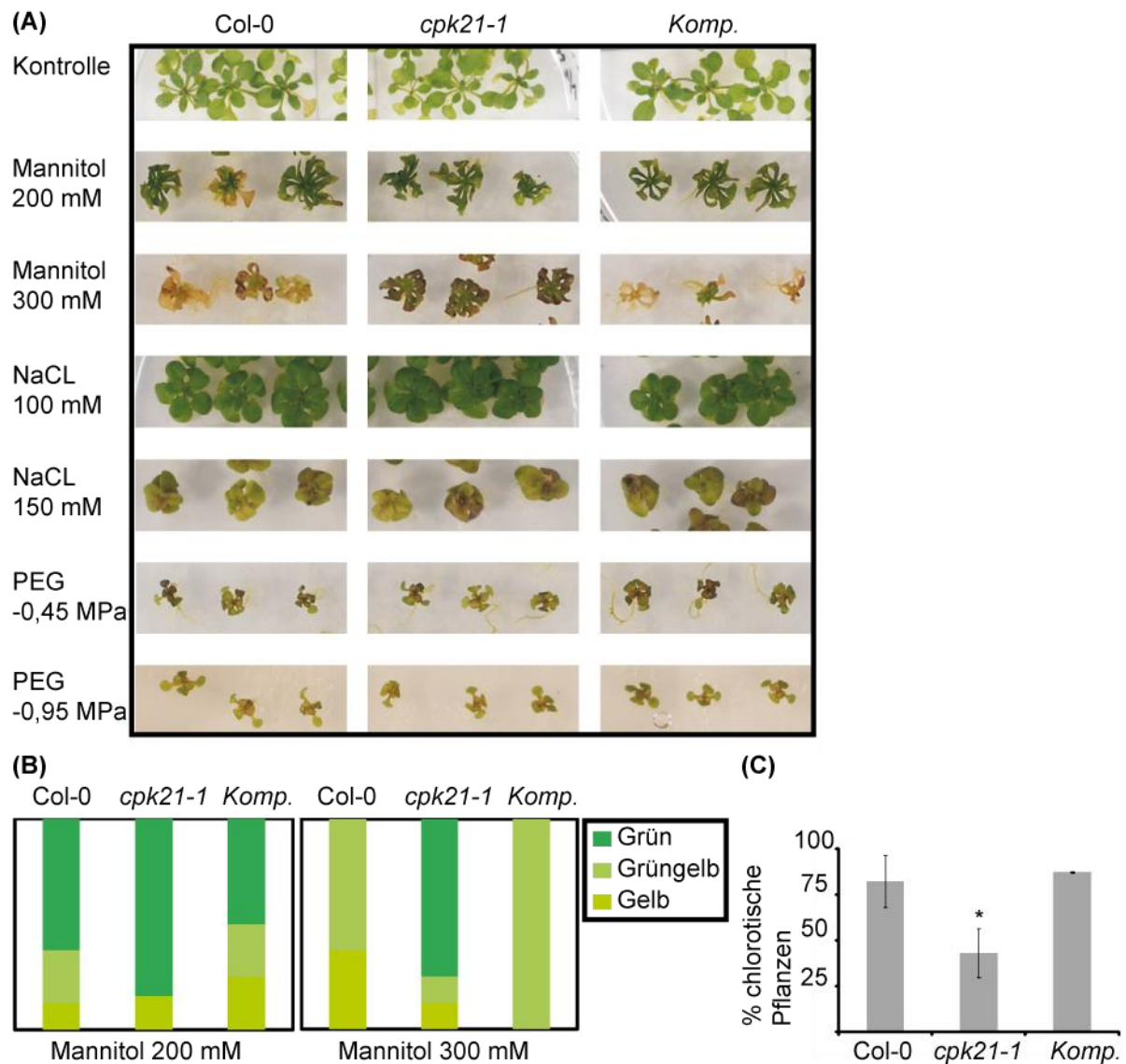


Abbildung 3–4: Phänotypische Untersuchung der osmotischen Stresstoleranz.

(A) – Analysiert wurden die Linien *cpk21-1*, Col-0 und *pCPK21::CPK21 (Komp.)* in Wachstumsversuchen auf 1 MS mit 3 % Saccharose (Kontrolle) in Kombination mit NaCl (100/150 mM), Mannitol (200/300 mM) und PEG (mit einem osmotischen Potenzial von $-0,45/-0,95$ MPa). Auf einem Kontrollmedium angezogene, eine Woche alte Keimlinge wurden auf die unterschiedlichen Medien umgesetzt. Die Auswertung erfolgte für viereinhalb oder dreieinhalb (für $-0,95$ MPa PEG) Wochen alte Keimlinge. (B) – Auswertung der osmotischen Stressversuche unter Verwendung von 200 mM bzw. 300 mM Mannitol. Dargestellt sind Mengenanteile für eine Platte von gesunden grünen Pflanzen (grün), Pflanzen mit Wachstumsverzögerungen und Chlorosen (grüngelb) und Pflanzen mit Wachstumsstagnation und starken chlorotischen Symptomen (gelb). (C) – Gesamtauswertung für 300 mM Mannitol: Die statistische Analyse umfasst fünf unabhängige Platten mit einer Gesamtzahl von 30–40 Individuen pro Linie. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung des prozentualen Anteils chlorotischer Pflanzen über die fünf Platten. Chlorotische Pflanzen sind in (B) als grüngelb oder gelb gezählt worden. Der mit dem Verfahren des Logit-Modell ermittelte statistisch signifikante Unterschied für die *cpk21-1* ist mit * bezeichnet (P-Wert < 1 %).

Unter Kontrollbedingungen konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen den untersuchten Linien beobachtet werden (Abbildung 3-4, Zeile 1). Mit unterschiedlichen Salz-

oder PEG-Konzentrationen zeigten sich, obwohl stressbedingte Chlorosen und Wachstumsreduktionen auftraten, keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 3-4, [A] Zeilen 4–7). Eine erhöhte Stresstoleranz im Vergleich zum Wildtyp konnte für die *cpk21-1*-Mutante bei Wachstumsanalysen auf 300 mM Mannitol und wenn auch reduziert, auf 200 mM Mannitol beobachtet werden (Abbildung 3-4, [A] Zeilen 2–3). So waren bei der Betrachtung einer Beispielplatte mit 300 mM Mannitol 75 % der Individuen der *cpk21-1*-Linie nach viereinhalb Wochen noch grün, während alle Pflanzen der Linien Col-0 und der Komplementationslinie *pCPK21::CPK21* leichte bis starke Chlorosen aufwiesen (Abbildung 3-4, [B] unten). Auch für 200 mM Mannitol konnte, wenn auch reduziert, diese verringerte Chlorosenbildung der *cpk21-1* beobachtet werden; hier waren 88 % der *cpk21-1*, aber nur 62 % von Col-0 und 50 % der Komplementationslinie grün und gesund (Abbildung 3-4, [B] oben). Die quantitative Gesamtauswertung für 300 mM Mannitol – diese umfasst 30–40 Pflanzen pro Linie – zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen der *cpk21-1*- und den Linien Col-0 oder *pCPK21::CPK21* (Abbildung 3-4 [C]). Diese erhöhte osmotische Stresstoleranz der *cpk21-1* gegenüber Col-0 auf 300 mM Mannitol konnte in fünf unabhängigen Versuchen wiederholt werden, wobei drei der fünf Untersuchungen von anderen Experimentatoren (Britta Ehlert/Sandra Franz) durchgeführt wurden. Auch wenn sich in all diesen Untersuchungen eine erhöhte osmotische Stressresistenz der *cpk21-1* gegenüber dem Wildtyp zeigte, konnten nie 100 % chlorotische Pflanzen für Col-0 oder 100 % grüne für die *cpk21-1* beobachtet werden. Noch einmal verdeutlicht, konnten in den hier beschriebenen Untersuchungen immer wieder chlorotische *cpk21-1*-Pflanzen und grüne Wildtypen beobachtet werden. Daher wurde zur statistischen Analyse das Logit-Modell verwendet, da diese gegenüber individuellen Schwankungen einer Population resistent ist. Vereinfacht wird analysiert, ob die Verteilung des untersuchten Merkmals (hier der Chlorosenbildung) bezüglich der Merkmalsträger (hier der Genotypen) zufällig zustande kommt. Die statistische Analyse ergab mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (P-Wert) < 1 % eine Abhängigkeit des Merkmals Chlorosen vom Genotyp. Die Komplementationslinie der *CPK21* unter dem nativen Promoter *pCPK21::CPK21* (Komp.) zeigte eine Reversion des *cpk21-1*-Phänotyps und ähnelte dem Wildtyp Col-0 (Abbildung 3-4). Die *cpk23-1* wurde in der Literatur als Trocken-, Salz- und gegenüber osmotischem Stress resistenter als der Wildtyp beschrieben und wird in dieser Arbeit phänotypisch nicht weiter untersucht (Ma und Wu 2007).

3.1.3 Analyse der abiotischen Stress- und ABA-abhängigen Markergene in *cpk21-1* und *cpk23-1*

Vordaten von Sandra Franz deuteten auf eine Hochregulierung verschiedener abiotischer Stress-Markergene unter Kontrollbedingungen (1 MS mit 3 % Saccharose) für beide T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp hin (Dissertation Sandra Franz 2008). In den hier

durchgeführten Untersuchungen wurde das osmotische Potenzial des Pflanzenmediums noch einmal reduziert und wurden 0,5 MS mit 1 % Saccharose als Bedingung gewählt. Nach vier Wochen Wachstum wurden, basierend auf den Voruntersuchungen, einige Markergene mithilfe semiquantitativer RT-PCR analysiert. Als Markergene wurden Dehydration Response Element Binding-Protein 1A (*DREB1A*), Responsive to Dessication 29A (*RD29A*) sowie Cold-Regulated 15A (*COR15A*) gewählt.

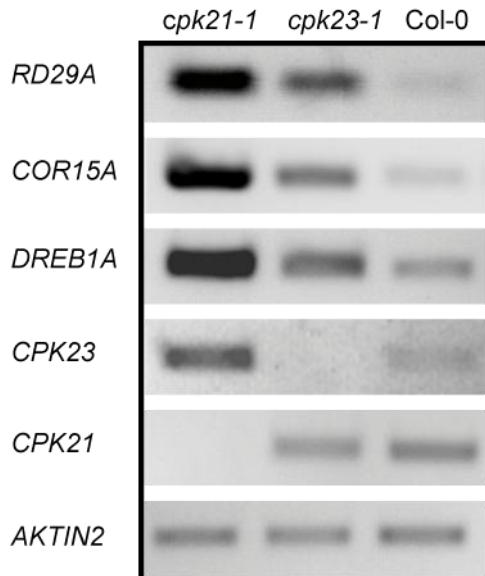


Abbildung 3–5: Die Expressionsanalyse der Markergene *RD29A*, *COR15A*, *DREB1A* und *CPK23* sowie *CPK21* unter Kontrollbedingungen. *AKTIN2* diente als cDNA-Mengen-Anpassungskontrolle. Die Untersuchung erfolgte mit einem Pool (aus vier Pflanzen) 25 Tage alter Keimlinge der Linien *cpk21-1*, *cpk23-1* und Col-0. Die Keimlinge wurden auf 0,5 MS mit 1 % Saccharose angezogen.

Analog zu den oben erwähnten Expressionsanalysen konnte auch in dieser Untersuchung eine Hochregulierung verschiedener Stress-Markergene in den Insertionslinien *cpk21-1* und *cpk23-1* im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 3-5). Die hier beobachtete Hochregulierung der Markergene könnte auf eine möglicherweise erhöhte Stressperzeption oder Signalweiterleitung in den *cpk21-1*- und *cpk23-1*-Linien hindeuten. Somit könnte in den T-DNA-Insertionsmutanten von einer fehlenden Repression bestimmter abiotischer Stress-Markergene unter den verwendeten Bedingungen ausgegangen werden. Auffällig war eine deutliche Hochregulierung des *CPK23*-Transkripts in der *cpk21-1*-Linie. Dies könnte zu einem den *CPK21*-Verlust kompensierenden Effekt führen. Eine Hochregulierung in der *CPK21*-Expression in der *cpk23-1*-Linie konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet werden, wurde aber von anderen Arbeitsgruppen unter abweichenden Bedingungen gezeigt (Geiger et al. 2010).

Dieser Effekt der Hochregulierung unterschiedlicher Markergene im Mutantenhintergrund sollte unter Verwendung einer Komplementationslinie erneut untersucht werden. Hierbei wurde auf die *CPK21* fokussiert, da bei der *cpk21-1*-Linie von einem Funktionsverlust der *CPK21* ausgegangen werden kann (Abschnitt 3.1.1.1). In diese Untersuchungen wurde eine Komplementationslinie der *cpk21-1* mit der *CPK21*-genomischen Sequenz unter dem nativen Promoter mit einbezogen. Des Weiteren wurde die Expressionsstärke der Markergene unter Stressbedingungen untersucht; dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Britta Ehlert.

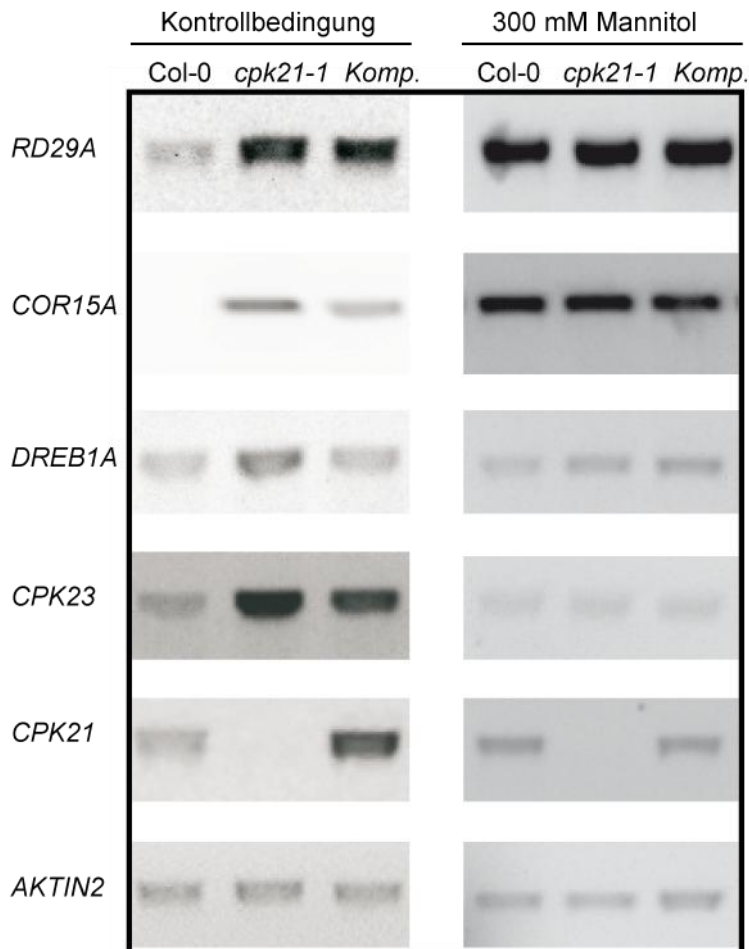


Abbildung 3-6: Die Expressionsanalyse der Markergene *RD29A*, *COR15A*, *DREB1A* und *CPK23* sowie *CPK21*. *AKTIN2* diente als cDNA-Mengen-Anpassungskontrolle. Die Untersuchung erfolgte mit einem Pool vier Wochen alter Pflanzen der Linien Col-0 und *cpk21-1*. Des Weiteren wurde eine Komplementationslinie (*Komp.*) *pCPK21::CPK21* im *cpk21-1*-genomischen Hintergrund verwendet. Die Keimlinge wurden auf 0,5 MS mit 1 % Saccharose (Kontrollbedingung) oder mit zusätzlichem osmotischem Stress (300 mM Mannitol) angezogen. Eine höhere Zyklenanzahl wurde unter Kontrollbedingungen (linke Spalte) im Vergleich zum osmotischen Stress (rechte Spalte) verwendet.

Auch in diesem Experiment zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine Hochregulierung der Markergene für abiotischen Stress (*RD29A*, *COR15A*, *DREB1A*) in der *cpk21-1*-Linie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3-6). Die Analyse der auf Mannitol angezogenen Pflanzen ergab für alle Linien eine gleichförmige Expression der untersuchten Markergene einschließlich fehlender vergrößerter Transkriptmengen in der *cpk21-1*-Linie. Eine deutlich geringere Expression der Markergene für abiotischen Stress trat in allen Linien ohne Stressapplikation im Vergleich zu den auf mannitolhaltigem Medium angezogenen Pflanzen auf. Deswegen musste unter Kontrollbedingungen eine erhöhte Zyklenanzahl verwendet werden. Daher ist der absolute Vergleich der Transkriptmenge mit oder ohne Stressbehandlung nicht möglich. Für die verwendete Linie *pCPK21::CPK21* konnte ein *CPK21*-Transkript im Gegensatz zur *cpk21-1*-Linie detektiert werden. In der Linie *pCPK21::CPK21* wurde im Vergleich zum Wildtyp eine vergrößerte *CPK21*-Transkript-Menge nachgewiesen (Abbildung 3-6). Dieser Effekt könnte auf Positionseffekte des Insertionsortes zurückzuführen sein. Auch strangoberhalb des verwendeten Promoterbereichs (800 bp vor dem *CPK21*-Startcodon) fehlende regulierende Elemente könnten zu Unterschieden in der *CPK21*-Expression führen. Auffällig war, dass für die *CPK23*-Expression unter abiotischen Stressbedingungen in der *cpk21-1* im Vergleich zu Col-0 kein Expressionsunterschied detektiert wurde (Abbildung 3-6). Unter Kontrollbedingungen war in Übereinstimmung mit

den Untersuchungen in Abschnitt 3.1.3 eine erhöhte *CPK23*-Expression in der *CPK21-1* nachweisbar. Diese Beobachtung könnte mit einer in anderen Untersuchungen gezeigten abiotischen Stress-abhängigen, transkriptionellen Herunterregulierung der *CPK23*-Genexpression zusammenhängen (Dissertation Sandra Franz 2008; mündliche Mitteilung Dr. Britta Ehlert). Die Analysen zeigten auch, dass die verwendete Komplementationslinie *pCPK21::CPK21* trotz vergrößerter *CPK21*-Transkript-Menge unter Kontrollbedingungen eine mit der *cpk21-1* vergleichbare *RD29A*-Expression aufweist (Abbildung 3-6). Im Gegensatz hierzu konnte für *COR15A* und *CPK23* eine zwischen Col-0 und *cpk21-1* intermediäre Expression und für *DREB1A* die für eine Komplementation erwartete, mit Col-0 vergleichbare Transkriptmenge detektiert werden (Abbildung 3-6). Zusammengefasst kann bezüglich der Repression bestimmter abiotischer Stress-Markergene nur eine partielle Komplementation durch *pCPK21::CPK21* beobachtet werden. Dies ist teilweise ein Widerspruch zu den phänotypischen Untersuchungen unter Bedingungen osmotischen Stresses, in denen eine Komplementation durch das Konstrukt *pCPK21::CPK21* beobachtet wurde.

3.1.4 Untersuchung der Funktion der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion

3.1.4.1 Analyse des Einflusses der CPK21 und CPK23 auf die Expression von *RD29B*

In den transkriptionellen Untersuchungen der abiotischen Stress-Markergene zeigte sich unter Kontrollbedingungen in den *cpk21-1*- und *cpk23-1*-Linien eine vermehrte Transkriptmenge (Abschnitt 3.1.3). Viele dieser untersuchten Markergene haben in ihrem Promoterbereich ABA-abhängige cis-regulatorische Elemente. Ein Markergen, das eine strikte ABA-abhängige Regulierung zeigt, ist *RD29B*; dieses weist im Promoterbereich zwei ABA-abhängige regulatorische Elemente (AREB) auf (Uno et al. 2000). Dieses Markergen wurde analog zu Abschnitt 3.1.3 in den Linien *cpk21-1* und *cpk23-1* untersucht.

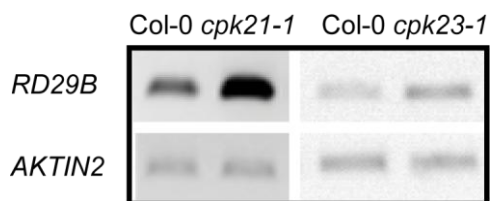


Abbildung 3–7: Die Expressionsanalyse des Markergens *RD29B*.

AKTIN2 diente als cDNA-Mengen-Anpassungskontrolle. Die Untersuchung erfolgte mit einem Pool vier Wochen alter Keimlinge der Linien *cpk21-1*, *cpk23-1* und Col-0. Die Keimlinge wurden auf 0,5 MS mit 1 % Saccharose angezogen. Die *cpk21-1*- und *cpk23-1*-Proben stammten aus zwei unterschiedlichen Experimenten, weswegen die entsprechenden Col-0-Vergleiche dargestellt sind. Die *cpk21-1* und die entsprechende Col-0 Probe stimmen mit denen in Abbildung 3-6 überein.

Auch für *RD29B* konnte im Vergleich zum Wildtyp in den Linien *cpk21-1* und *cpk23-1* eine Hochregulierung beobachtet werden. Des Weiteren konnte in unveröffentlichten Daten für

die homologe *CPK23* aus *Landsberg erecta* eine regulatorische Funktion der CPK23 auf die ABA-abhängige *RD29B*-Expression gezeigt werden (mündliche Mitteilung Prof. Dr. Erwin Grill). Unter Verwendung eines *pRD29B::LUC*- (Luciferase-) Konstrukts als molekularbiologischer Marker sollte der Einfluss der CPK21 und CPK23 auf die ABA-abhängige Signaltransduktion transient in *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten untersucht werden.

3.1.4.1.1 Untersuchung der *RD29B*-Expression in *cpk21-1*- und *cpk23-1*-Protoplasten

2009 konnten zwei Gruppen eine Proteinfamilie, die als RCAR- oder PYR-Familie bezeichnet wird, als ABA-Rezeptoren identifizieren (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Des Weiteren konnten Ma et al. (2009), unter Verwendung des Konstrukts *pRD29B::LUC* in *A. thaliana*-Protoplasten zeigen, dass der ABA-Rezeptor RCAR1 bereits ohne exogene ABA-Zugabe zur Erhöhung der Luciferaseaktivität führt. Ma et al. (2009) postulierten eine Induktion der ABA-Signaltransduktion durch Bindung endogener ABA an den überexprimierten Rezeptor. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die *pRD29B::LUC*-Induktion durch RCAR1-Überexpression in der *cpk21-1*- und der *cpk23-1*-Linie untersucht (Abbildung 3-8).

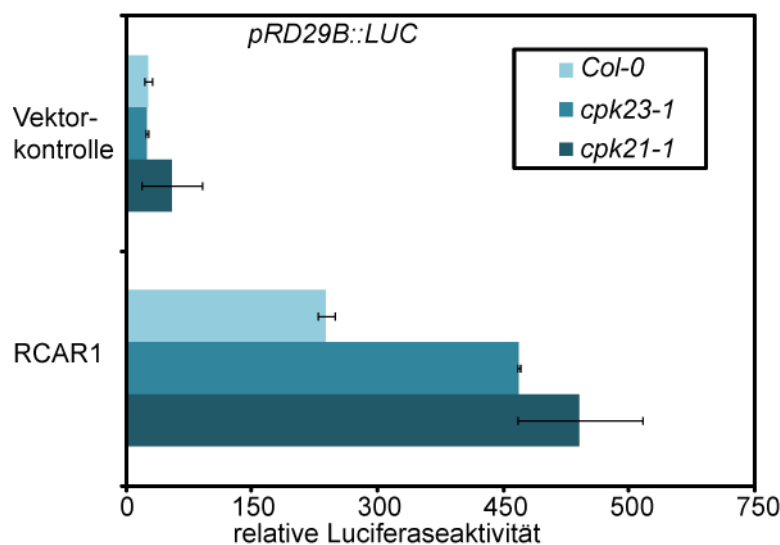


Abbildung 3–8: Untersuchung der RCAR1-abhängigen *RD29B*-Expression in den Linien *cpk21-1* und *cpk23-1*.

Die Luciferaseaktivität wurde mithilfe eines kotransfizierten β -GUS-Konstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des Ubiquitin-Promoters normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelwerten und die Standardabweichung als Fehlerbalken.

Analog zu Ma et al. zeigte sich für die transkriptionelle Kontrolle des *RD29B*-Promoters bei Kotransfektion mit RCAR1 eine erhöhte Luciferaseaktivität (Abbildung 3-8). Im *cpk21*- und *cpk23*-Mutanten-Hintergrund konnte im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Induktion der Luciferaseexpression in Abhängigkeit von RCAR1 beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich eine gesteigerte Luciferaseaktivität für die *cpk21-1* um 117 % bzw. 126 % und für die *cpk23-1* um 80 % bzw. 96 %.

3.1.4.1.2 Untersuchung des Einflusses von CPK23 auf die ABA- und RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression

Im vorangegangenen Abschnitt konnte in der *cpk23-1*-T-DNA-Insertionslinie eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte RCAR1-abhängige Induktion der *RD29B*-Transkription beobachtet werden. Im nächsten Schritt wurde unter Verwendung eines *CPK23*-Überexpressionskonstrukts (*p35S::CPK23*) der Einfluss der CPK23 auf die RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression untersucht. Als Vergleich diente eine inaktive Variante der CPK23, als CPK23D193A bezeichnet. In einem ersten Ansatz wurde der Einfluss der CPK23 auf die RCAR1-abhängige Induktion von *pRD29B::LUC* ohne exogene ABA-Zugabe untersucht. Die in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen erfolgten in Col-0-Protoplasten.

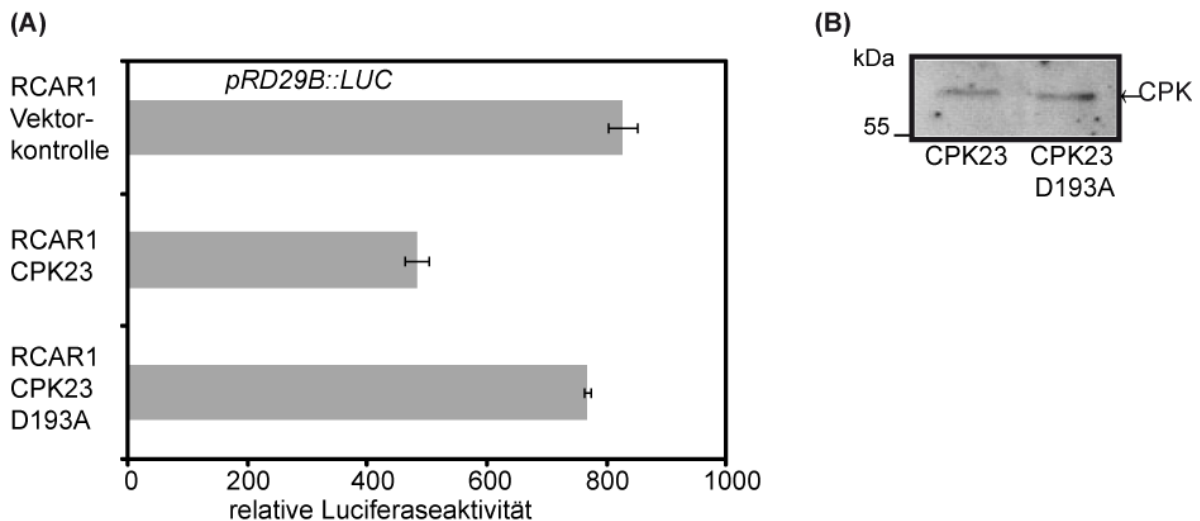


Abbildung 3-9: Untersuchung des Einflusses der CPK23 auf die RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression.

(A) – Die Luciferaseaktivität wurde mithilfe eines kotransfizierten β -GUS-Konstrukts unter den Ubiquitin-Promoter normalisiert. Mittelwerte von Doppelwerten und die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt. (B) – Expressionsmengenkontrolle der Strep-II-markierten verwendeten Kinasen; Nachweis mit Strep-Tactin-HRP-Konjugat nach Aufreinigung über Affinitätschromatografie.

Für die Koexpression der inaktiven Variante CPK23D193A konnte eine mit der Vektorkontrolle vergleichbare Luciferaseaktivität gemessen werden (Abbildung 3-9). Die Überexpression der CPK23 führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität (Abbildung 3-9). Die Luciferaseaktivität war im Vergleich zur CPK23D193A-Probe um 37 % reduziert. Diese Reduktion der *pRD29B*-abhängigen Luciferaseexpression konnte in vier unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Im Vergleich zur entsprechenden inaktiven Variante wurde eine Reduktion zwischen 37 % und 76 % beobachtet (gemessene Reduktionen: 37 %, 46 %, 63 %, 76 %). Auch wenn in allen Untersuchungen ein negativer regulatorischer Einfluss der aktiven CPK23 auf die RCAR1-abhängige *pRD29B*-Regulierung beobachtet werden konnte, fielen Schwankungen in der Stärke des Effekts auf. Diese Schwankungen könnten durch

Unterschiede im endogenen ABA-Gehalt, Mengenunterschiede an exprimierten Proteinen oder Abweichungen in der Protoplastenqualität zustande kommen.

In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss der CPK23 auf die durch exogene ABA-Zugabe induzierte RCAR1-abhängige *RD29B*-Transkription analysiert werden.

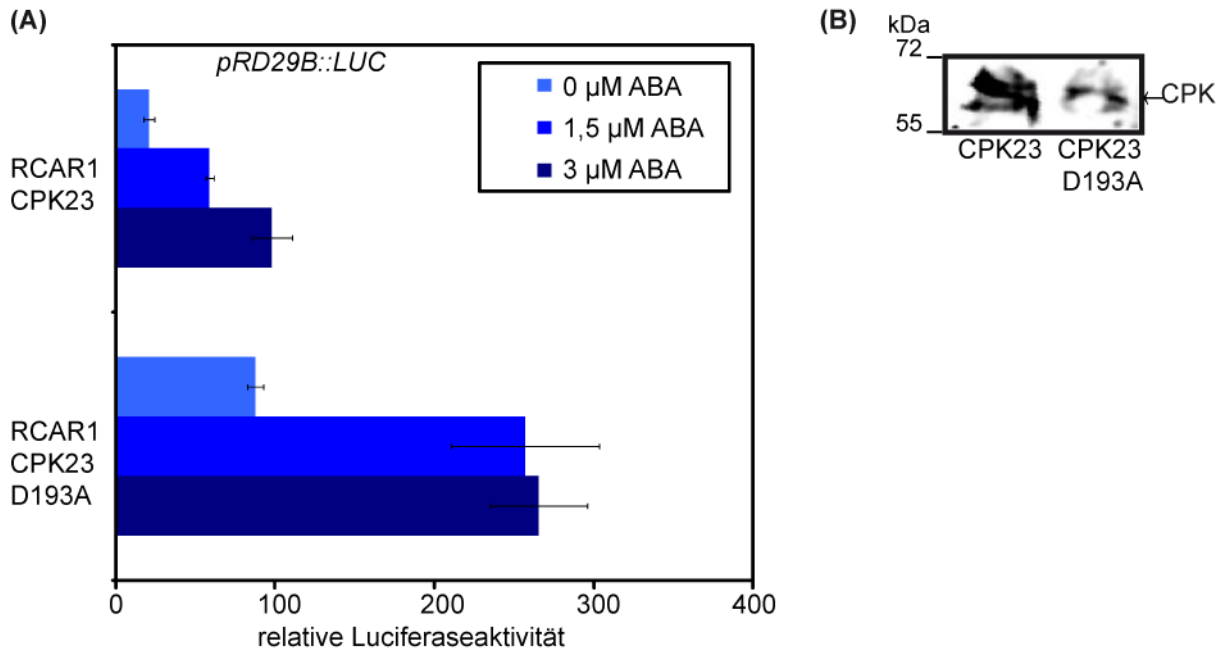


Abbildung 3–10: Analyse der regulatorischen Funktion der CPK23 auf die ABA-induzierte RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression.

(A) – Die Luciferaseaktivität wurde mithilfe eines kotransfizierten β -GUS-Konstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des Ubiquitin-Promoters normalisiert. Mittelwerte von Doppelwerten und die Standardabweichung sind als Fehlerbalken dargestellt. (B) – Expressionsmengenkontrolle der Strep-II-markierten verwendeten Kinasen; Nachweis mit Strep-Tactin-HRP-Konjugat nach Aufreinigung über Affinitätschromatografie.

Auch bei exogener ABA-Applikation zeigte sich im Vergleich zum CPK23D193A-Ansatz eine CPK23-abhängige Reduktion der Luciferaseaktivität (Abbildung 3-10). Dies wurde für 3 µM ABA in drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Im Vergleich zur entsprechenden inaktiven Kinase konnte eine Reduktion zwischen 33 % und 63 % beobachtet werden (gemessene Reduktionen: 33 %, 54 %, 63 %). Auch in diesen Experimenten wurde, wie bereits für die Untersuchungen ohne exogene ABA-Zugabe, ein reproduzierbarer Effekt beobachtet, der aber in der Stärke der Ausprägung variierte. Diese Schwankungen könnten durch Unterschiede in der Menge des exprimierten Proteins oder Abweichungen in der Protoplastenqualität zustande kommen.

3.1.4.1.3 Untersuchung des Einflusses der CPK21 auf die ABA- und RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression

Aufgrund der großen Homologie der CPK21 und CPK23 und aufgrund der in den beiden T-DNA-Insertionslinien übereinstimmend bestehenden Hochregulierung einiger Markergene für abiotischen Stress sollte auch die Funktion der CPK21 analog zur CPK23 für die ABA-

abhängige *RD29B*-Regulierung untersucht werden. Der Einfluss der CPK21 auf die RCAR1-abhängige Induktion von *pRD29B::LUC* ohne exogene ABA-Zugabe wurde in Col-0-Protoplasten untersucht. Zur Sicherung der Qualität des Experiments wurde parallel auch die CPK23 untersucht.

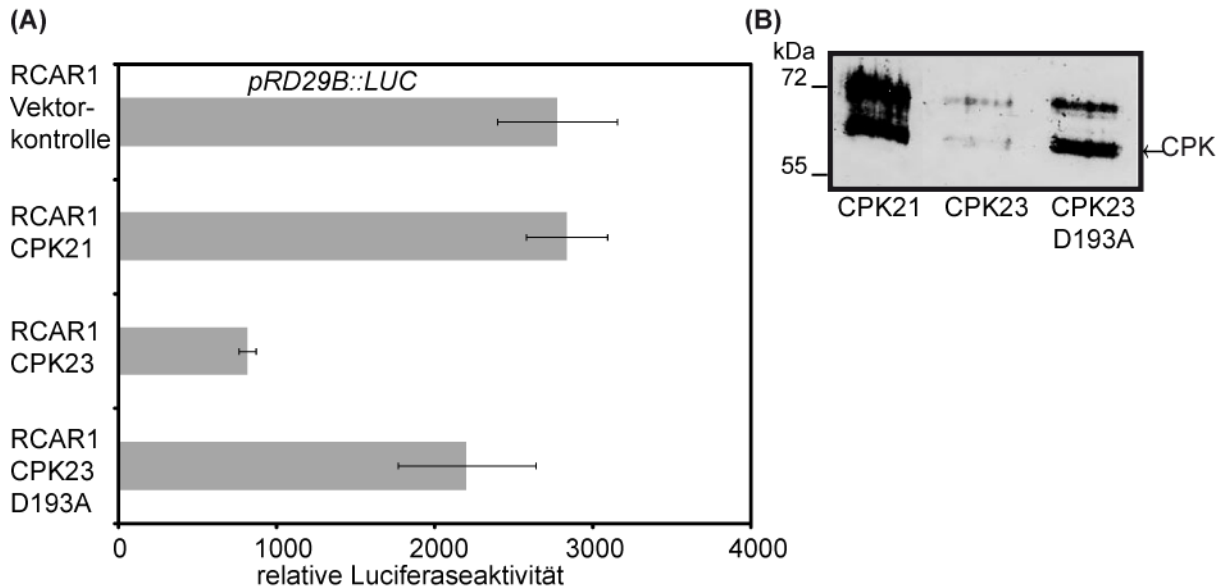


Abbildung 3–11: Untersuchung des Einflusses der CPK21 auf die RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression.

(A) – Die Luciferaseaktivität wurde mithilfe eines kotransfizierten β -GUS-Konstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des Ubiquitin-Promoters normalisiert. Mittelwerte von Doppelwerten und die Standardabweichung sind als Fehlerbalken dargestellt. (B) – Expressionsmengenkontrolle der Strep-II-markierten verwendeten Kinasen; Nachweis mit Strep-Tactin-AP-Konjugat-Aufreinigung über Affinitätschromatografie.

Für die CPK21 konnte im Vergleich zur Vektorkontrolle keine Reduktion der Luciferaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 3-11), wohingegen für die CPK23 im Vergleich zur Vektorkontrolle oder der inaktiven Variante CPK23D193A eine Reduktion der Luciferaseaktivität gemessen wurde (Abbildung 3-11).

In einem weiteren Ansatz wurde eine konstitutiv aktive CPK-Variante, CPK21vk, verwendet. Dieser C-terminalen verkürzten Variante fehlt das Pseudosubstratsegment und die CLD, wodurch sie unabhängig von Ca^{2+} eine aktive Konformation einnehmen kann. Dies ermöglicht es, den Einfluss der Kinase auf die *RD29B*-Transkription unabhängig von der Konzentration von freiem Ca^{2+} zu untersuchen. Dadurch könnten Effekte, die durch das Fehlen des für die Ca^{2+} -Oszillation wichtigen Extrazellularraums auftreten, umgangen werden.

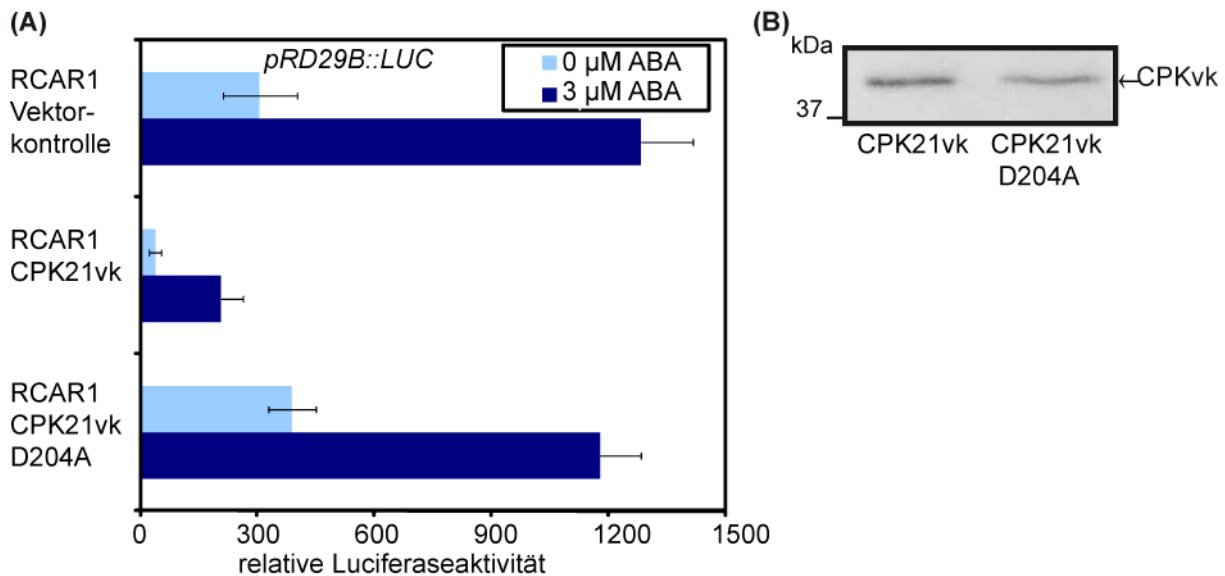


Abbildung 3–12: Untersuchung des Einflusses der konstitutiv aktiven CPK21vk und einer inaktiven Variante CPK21vkD204A auf die RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression.

(A) – Die Luciferaseaktivität wurde mithilfe eines kotransfizierten β -GUS-Konstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des Ubiquitin-Promoters normalisiert. Mittelwerte von Doppelwerten und die Standardabweichung sind als Fehlerbalken dargestellt. (B) Expressionsmengenkontrolle der HA-Strep-II-markierten verwendeten Kinasen; Nachweis der HA-Markierung mithilfe eines AP-Konjugats nach Aufreinigung über Strep-II-Affinitätschromatografie.

Für die *pRD29B:LUC*-Induktion konnte bei CPK21vk-Koexpression eine Reduktion der Luciferaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 3-12). Dies zeigte sich bei der sowohl durch RCAR1-Kotransfektion als auch durch exogene ABA-Zugabe vermehrten *pRD29B:LUC*-Transkription (Abbildung 3-12). Die Luciferaseaktivität war im Vergleich zur CPK21vkD204A-Probe ohne exogene ABA-Zugabe um 90 % und bei Zugabe von 3 μM ABA um 82 % reduziert. Diese Reduktion der *pRD29B*-abhängigen Luciferaseexpression konnte in vier unabhängigen Experimenten (ohne exogene ABA) und in zwei unabhängigen Experimenten (3 μM ABA) bestätigt werden. Im Vergleich zur entsprechenden inaktiven Variante konnte bei den Ansätzen ohne ABA-Zugabe eine Reduktion um zwischen 49 % und 91 % (gemessene Reduktionen: 49 %, 52 %, 81 %, 91 %) und bei 3 μM ABA um zwischen 90 % und 82 % beobachtet werden (gemessene Reduktionen: 82 %, 90 %). Der Unterschied zwischen der CPK21 und der Ca^{2+} -unabhängig aktiven CPK21vk sowie der CPK23 und der CPK21 ist im Zusammenhang mit einer möglicherweise unterschiedlichen Ca^{2+} -Selektivität interessant (Abbildungen 3-11 und 3-12). Die Ca^{2+} -Selektivität beider Enzyme wird in Abschnitt 3.2 bei der biochemischen Charakterisierung untersucht.

3.1.4.2 Interaktions- und regulatorische Analyse mit anderen Komponenten der ABA-Signaltransduktion

Fuji et al. (2009) konnten eine Gruppe von Komponenten identifizieren, die hinreichend für die ABA-Signaltransduktion von der ABA-Rezeptor-Bindung bis zur transkriptionellen Regulierung der ABA-abhängigen Gene zu sein scheinen. Diese Komponenten sind eine

Gruppe von ABA-Rezeptoren (PYR/PYL-RCAR), eine mit diesen interagierende Gruppe von Phosphatasen (PP2Cs), die von diesen regulierte Kinasen (SnRK2s) und die Transkriptionsfaktoren deren Substrate (ABFs) (Fujii et al. 2009). Mehrere Untersuchungen legten einen ähnlichen regulatorischen Komplex in Spaltöffnungen nahe, der sich aus PYR-RCAR-PP2C-SnRK2 zusammensetzt, aber der Regulierung von Ionenkanälen dient (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Sato et al. 2009; Vahisalu et al. 2010). Auch wenn diese Komponenten das „Grundgerüst“ der ABA-Signaltransduktion darstellen, bleibt die Frage offen, wie andere bekannte Komponenten der ABA-Signaltransduktion mit diesen in Wechselwirkung stehen. So konnte z. B. für die Ca^{2+} -Konzentration ein regulatorischer Effekt nachgewiesen werden (Hetherington 2001; Schroeder et al. 2001b; Hirayama und Shinozaki 2007; Siegel et al. 2009). Für das ABA-Signaltransduktionsgrundgerüst PYR-RCAR-PP2C-SnRK2 wird keine direkte Ca^{2+} -Bindung angenommen (Hubbard et al. 2010). Eine mögliche Vernetzung der Komponenten der ABA-Signaltransduktion und der Ca^{2+} -abhängigen Proteine, wie der hier untersuchten CPKs, erscheint somit von Interesse. Aufgrund der oben gezeigten Funktion der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion waren mögliche Interaktionen mit Komponenten der ABA-Signaltransduktion in den letzten drei Jahren Gegenstand verschiedener Untersuchungen (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Integration der CPK21 und CPK23 in die ABA-Signaltransduktion werden in den folgenden Abschnitten dargelegt.

3.1.4.2.1 Interaktionsstudien einer CPK23 homologen LerCDPK mit ABI2

In Hefe-Zweihybrid-Interaktionsanalysen konnte die PP2C-**ABA-Insensitive-2** (ABI2) als Interaktionspartner einer zu CPK23 homologer CDPK aus *Landsberg erecta* (LerCDPK) identifiziert werden (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Erwin Grill). ABI2 wird als ABA-abhängige Phosphatase PP2C in der ABA-Signaltransduktion beschrieben (Abschnitt 1.4.2). Die Interaktion zwischen LerCDPK und ABI2 wurde mithilfe einer „**Co-Immunopräzipitation**“ Co-IP *in vivo* überprüft. Da ABI2 mit GFP markiert war, diente freies GFP als Negativkontrolle. Als Vergleich bezüglich der Interaktionsspezifität wurde die homologe CPK21 verwendet. Die analysierten Proteine wurden in *A. thaliana*-Protoplasten exprimiert und über Strep-II-Affinitätschromatografie aufgereinigt.

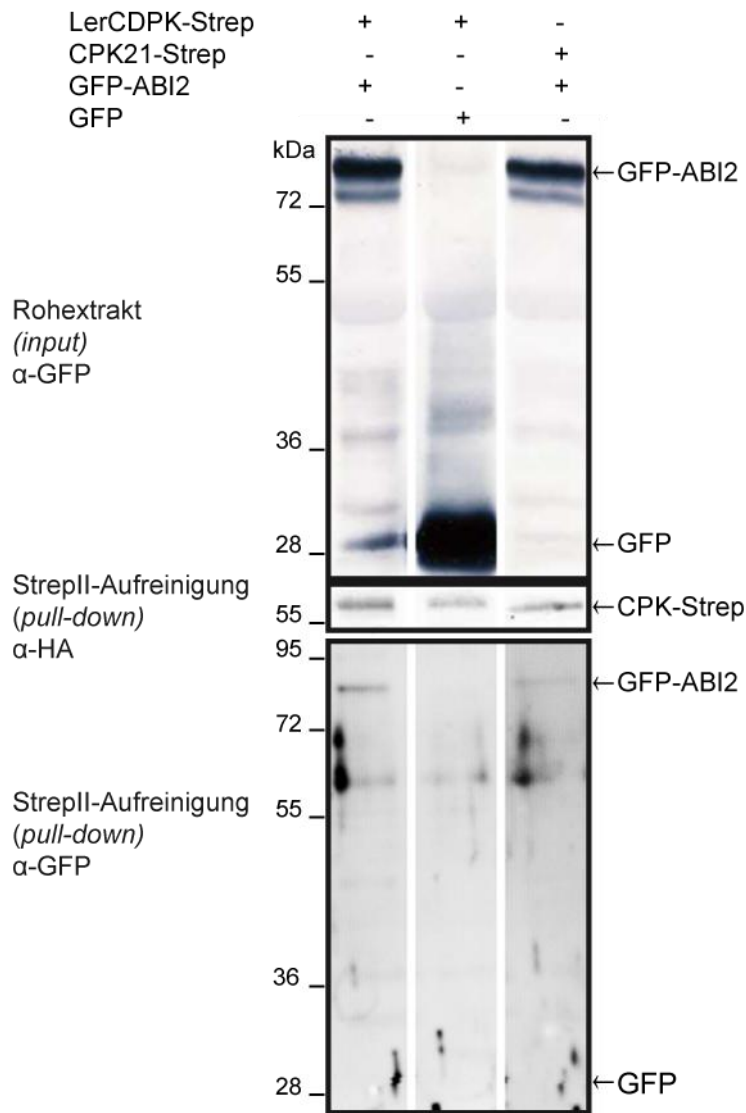


Abbildung 3–13: Interaktionsanalysen einer zur CPK23 homologen CDPK aus *Landsberg erecta* (LerCDPK) und ColCPK21 mit ABI2 *in vivo*. *Arabidopsis*-Protoplasten wurden mit den angegebenen Konstrukten (+), transfiziert. Gesamtproteinextrakt (Rohextrakt) und über Strep-II-Affinitätschromatografie aufgereinigte Proteine (Strep-Aufreinigung) wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte entweder mit HA-AP-Konjugat (mittlere Zeile) oder α -GFP-Antikörper (obere [AP-Konjugat] und untere [HRP-Konjugat] Zeile).

Der Expressionsnachweis im Rohextrakt ergab für ABI2 in der Koexpression mit LerCDPK und CPK21 vergleichbare Proteinmengen (Abbildung 3-13). In der Strep-II-Aufreinigung konnte eine stärkere Anreicherung bei Koexpression mit der LerCDPK beobachtet werden als mit der CPK21 (Abbildung 3-13). Keine Anreicherung von GFP konnte in der Strep-II-Aufreinigung, trotz der im Vergleich zu GFP-ABI2 vergrößerten Proteinmenge im Rohextrakt, beobachtet werden. Zusammengefasst deutet dieses Ergebnis auf eine Interaktion zwischen LerCDPK und ABI2 hin. ColCPK21 scheint unter diesen Bedingungen, wenn auch deutlich schwächer, ebenfalls mit ABI2 zu interagieren.

3.1.4.2.2 Slow- (langsame) Anionenkanäle als *in vivo* Interaktoren der CPK21 und CPK23

Ein weiterer, sehr gut untersuchter Mechanismus ist die ABA-abhängige Regulierung des Schließens der Stomata. Ein wichtiger Schritt zum ABA-abhängigen Schließen der Stomata ist der auswärts gerichtete Anionenstrom (Schroeder et al. 2001b; Joshi-Saha et al. 2011). 2008 konnte ein Anionenkanal, genauer der „**S**low **V**oltage **A**nion **C**hannel **1**“ (SLAC1), der

für das Schließen der Stomata notwendig ist, identifiziert werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Des Weiteren konnten SLAC1-homologe Kanäle (SLAHs) identifiziert werden, von denen eine ähnliche Funktion angenommen wird, da für eine SLAC1-Mutante eine partielle Komplementation durch Überexpression von SLAHs beobachtet werden konnte (Negi et al. 2008). Daten aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Reiner Hedrich zeigten in *Xenopus*-Oozyten einen von der CPK21- und CPK23-Koexpression abhängigen SLAC1-Anionenstrom (Geiger et al. 2010). Auch ein CPK21-abhängiger **SLAC1-Homologes-3**- (SLAH3-) Anionenstrom konnten in *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden (Geiger et al. 2011). In diesem Zusammenhang wurde eine Interaktionsanalyse *in vivo* mithilfe einer Co-IP von SLAC1 und CPK23 durchgeführt. Des Weiteren wurde die CPK21- und ABA-abhängige *in vivo* Phosphorylierung des SLAH3-N-Terminus (NT-SLAH3) untersucht.

3.1.4.2.3 Interaktionsanalysen der CPK23 mit NT-SLAC1

Die postulierte Interaktion der CPK23 und SLAC1 sollte *in vivo* durch Co-IP untersucht werden. Hierbei wurde der zytosolische SLAC1-N-Terminus (NT-SLAC1) verwendet, da hier in *in vitro* Kinaseaktivitätsmessungen eine CPK23-abhängige Phosphorylierung gezeigt werden konnte, wobei als Kontrolle der nichtphosphorylierte zytosolische SLAC1-C-Terminus (CT-SLAC1) diente (Geiger et al. 2010). Dieser Versuch wurde mit Unterstützung von Susanne Matschie durchgeführt. Als positive Kontrolle diente der bekannte Interaktor OST1 (Geiger et al. 2009).

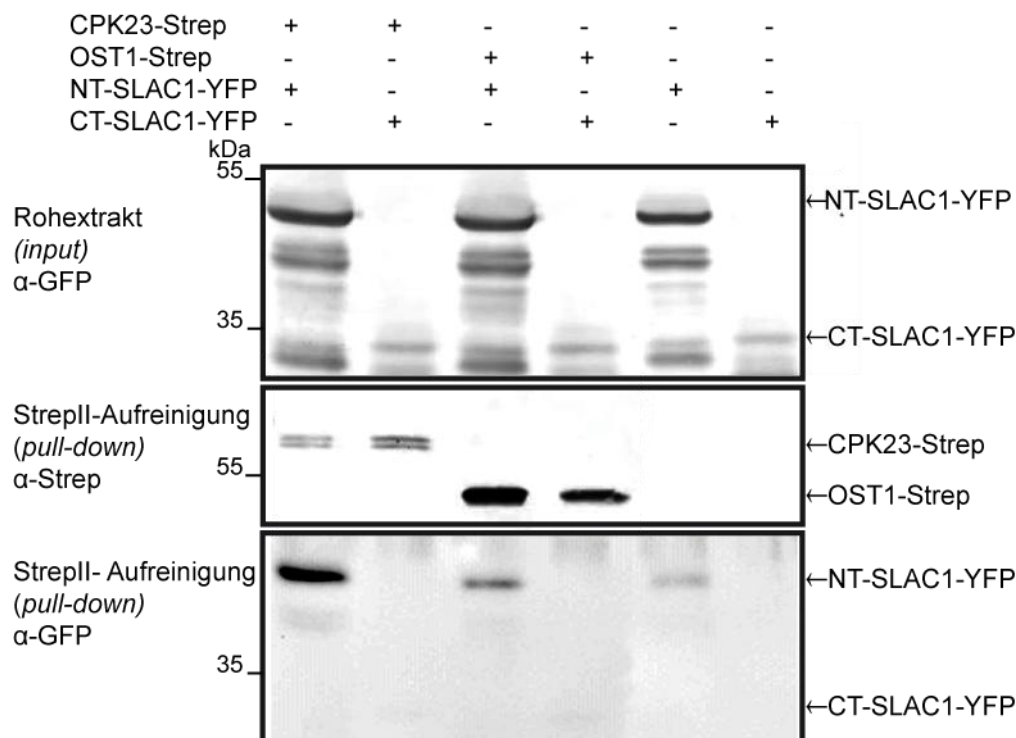


Abbildung 3–14: Interaktionsstudien der CPK23 und OST1 mit NT-SLAC1 und CT-SLAC1 *in vivo*.

Arabidopsis-Protoplasten wurden mit den angegebenen Konstrukten (+) transfiziert. Gesamtproteinextrakt (Rohextrakt) und über Strep-II-Affinitätschromatografie aufgereinigte Proteine (Strep-II-Aufreinigung) wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte entweder mit Strep-Tactin-AP-Konjugat (mittlere Zeile) oder α -GFP-Antikörper (obere [AP-Konjugat] und untere [HRP-Konjugat] Zeile).

Für alle NT-SLAC1-YFP exprimierenden Proben konnten im Proteinrohextrakt vergleichbare Proteinmengen nachgewiesen werden (Abbildung 3-14). Eine deutliche Anreicherung von NT-SLAC1-YFP zeigt sich bei der CPK23-Strep-II-affinitätschromatografischen Aufreinigung im Vergleich zu OST1-Strep-II oder der entsprechenden Einzeltransfektion (Abbildung 3-14). Beim direkten Vergleich der NT-SLAC1-YFP-Anreicherung mit OST1-Strep-II und der Probe ohne Kinase wies der OST1-Ansatz eine erhöhte Proteinmenge an NT-SLAC1 auf (Abbildung 3-14). Für CT-SLAC1 konnte in keiner Strep-Aufreinigung ein Signal detektiert werden (Abbildung 3-14). Zusammengefasst deutet dieses Ergebnis auf eine Interaktion zwischen der CPK23 und NT-SLAC1 sowie, wenn auch unter diesen Bedingungen schwächer, zwischen OST1 und NT-SLAC1 hin. Dieses Ergebnis konnte in Interaktionsstudien unter Verwendung des „**B**ifluorescence **C**omplementation Assay“ (BiFC) durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Reiner Hedrich in einem 2010 publizierten Artikel, der auch diese Ergebnisse beinhaltet, bestätigt werden (Geiger et al. 2010).

3.1.4.2.4 Nachweis der *in vivo* Phosphorylierung von NT-SLAH3 durch CPK21

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Reiner Hedrich konnte zeigen, dass *in vitro* die CPK21 den zytosolischen N-Terminus von SLAH3 (NT-SLAH3) phosphorylierte (Geiger et al. 2011). Auch konnte mithilfe des BiFC in *Arabidopsis*-Protoplasten eine *in vivo* Interaktion von SLAH3 und CPK21 gezeigt werden (Geiger et al. 2011). In dieser Arbeit wurde die *in vivo* Phosphorylierung von NT-SLAH3 in Abhängigkeit von der Koexpression der CPK21- und ABA-Zugabe analysiert. Dies erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs, der phosphorylierte Proteine selektiv anfärbt („ProQ[®] Diamond“). Die Analysen erfolgten im *cpk21-1*-Mutanten-Hintergrund.

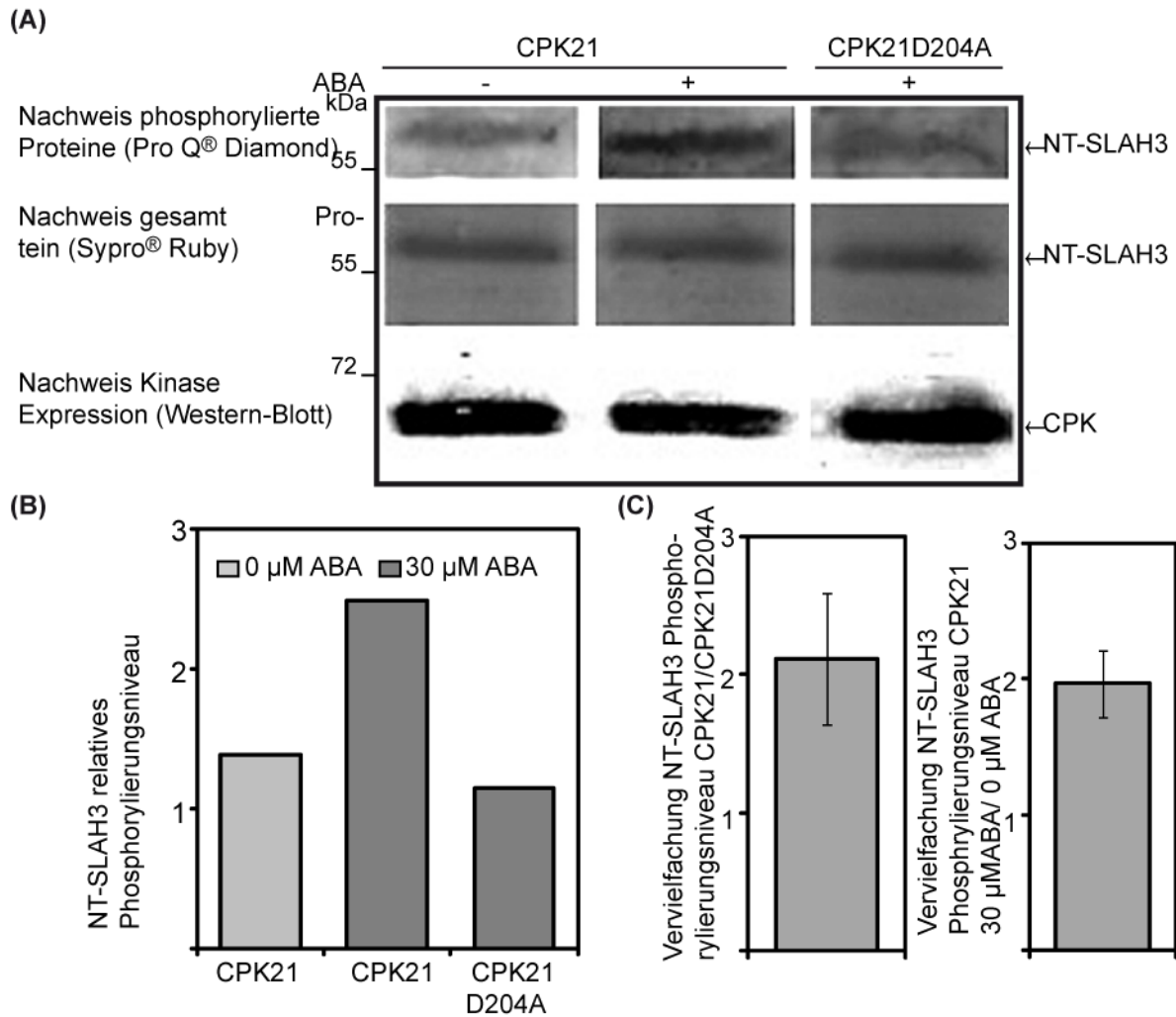


Abbildung 3–15: Analyse der ABA- und CPK21-abhängigen NT-SLAH3-Phosphorylierung. (A) – NT-SLAH3 wurde mit CPK21 oder der inaktiven Variante CPK21D204A in Protoplasten als Strep-II-markierte Proteine exprimiert. Die Protoplasten wurden mit 30 μM ABA (+) oder der entsprechenden Pufferkontrolle (-) für 40 Minuten inkubiert. Nach der Strep-II-Affinitätschromatografie wurden die isolierten Proteine auf Phosphorylierung („ProQ[®] Diamond“/obere Zeile für NT-SLAH3), Proteinmengen („Sypro[®] Ruby“/mittlere Zeile für NT-SLAH3) oder Expression (Western-Blot α -HA-AP/untere Zeile für die CPK21) untersucht. Die Fluoreszenz-Signal-Intensität wurde für „ProQ[®] Diamond“ und „Sypro[®] Ruby“ quantifiziert. (B) – Zur Analyse des SLAH3-Phosphorylierungsniveaus wurden die Phosphorylierungssignalintensitäten mit der entsprechenden Proteinmenge normalisiert. (C) – Zunahme der NT-SLAH3-Phosphorylierung durch CPK21-Koexpression im Vergleich zur inaktiven Variante in Gegenwart von ABA (linke Spalte) und ABA-abhängiger Anstieg der NT-SLAH3-Phosphorylierung bei CPK21-Koexpression (rechte Spalte). Die Analyse des SLAH3-Phosphorylierungsniveaus erfolgte wie in (B) beschrieben (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung).

Eine Zunahme der „ProQ[®] Diamond“-Bandenstärke bei gleichbleibender Proteinmenge konnte bei CPK21-Kotransfektion nach ABA-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 3-15). Dies deutet auf einen Zuwachs an phosphorylierten NT-SLAH3 hin. Auch ein Anstieg des NT-SLAH3-relativen Phosphorylierungsniveaus in Gegenwart von ABA bei Koexpression der CPK21 im Vergleich zu einer inaktiven Variante CPK21D204A konnte gezeigt werden (Abbildung 3-15). Diese Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Gemessen wurde eine Zunahme des NT-SLAH3-relativen

Phosphorylierungsniveaus für die CPK21 im Vergleich zu CPK21D204A in Gegenwart von ABA um zwischen 1,6- und 2,6-fach und nach ABA-Zugabe bei CPK21-Expression um zwischen 1,8- und 2,1-fach. Zusammengefasst konnte eine ABA- und CPK21-abhängige Zunahme der NT-SLAH3 Phosphorylierung beobachtet werden. Dies deutet auf NT-SLAH3 als ein mögliches *in vivo* Substrat der CPK21 hin. Diese Annahme wurde in weiteren unabhängigen Experimenten durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Reiner Hedrich in einem 2011 publizierten Artikel bestätigt, der auch diese Ergebnisse beinhaltet (Geiger et al. 2011).

3.2 Biochemische Charakterisierung der CPK21 und CPK23

Einen wichtigen Aspekt dieser Arbeit stellt die biochemische Charakterisierung der CPK21 und CPK23 dar. Insbesondere wird die Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPK23 mit der der CPK21 verglichen. Der Vergleich zweier so homologer Kinasen ermöglicht es, Unterschiede in der biochemischen Aktivität mit Aminosäuresequenzunterschieden zu korrelieren. Solche identifizierten Unterschiede sollten unter Verwendung entsprechender Mutanten genauer untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der CPKs zu gewinnen.

3.2.1 Ca^{2+} -Abhängigkeit der *in vitro* Kinaseaktivität der CPK23 und CPK21

Zur biochemischen Charakterisierung wurde die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität der CPK21 und CPK23 *in vitro* analysiert. Die Kinasen wurden als GST-markierte Proteine in *E. coli* überexprimiert und über Affinitätschromatografie isoliert. Als Substrat diente das *in vivo* Substrat SLAC1, wobei entweder der gesamte N-Terminus (NT-SLAC1) oder ein SLAC1-Peptid (SLAC1.1) verwendet wurde. Dass die CPK23 SLAC1.1 mit einer hohen Aktivität als Substrat phosphoryliert, konnte durch Verwendung von 21-25 langen Peptiden, welche die gesamte N-terminale Domäne von SLAC1 abdecken, gezeigt werden (Dr. Geiger persönliche Mitteilung).

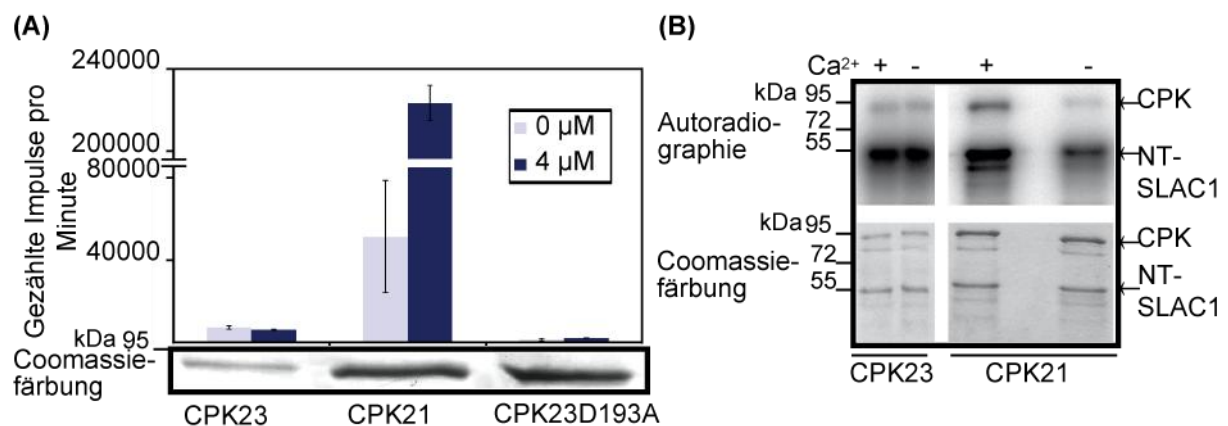


Abbildung 3–16: Die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität der CPK21 und CPK23. (A) – Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivitätsmessung der CPK21, CPK23 und einer inaktiven Variante CPK23D193A mit dem SLAC1-Peptid SLAC1.1 (RGPNRGKQRPFGRGFSRQVSL). Die

Konzentrationen von freiem Ca^{2+} sind in der Legende angegeben. Die Mengenkontrolle der in (A) verwendeten Kinasen erfolgte mithilfe von Coomassie-Färbung (untere Zeile). (B) – Die Analyse der Ca^{2+} -abhängigen Kinaseaktivität erfolgte mit NT-SLAC1 als Substrat und $4 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} (+) oder 5 mM EGTA (-). Die obere Zeile zeigt die Autoradiografie, die untere Zeile die Proteinmengenbestimmung von demselben Gel mithilfe von Coomassie-Färbung.

Für die CPK21 konnte eine Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 3-16). Dieses Verhalten wurde für die CPK21 in der Literatur beschrieben (Geiger et al. 2010; Franz et al. 2011; Geiger et al. 2011). Die CPK23 zeigte im Gegensatz zur CPK21 eine geringere Aktivität, wobei Unterschiede in den Proteinmengen diesen Vergleich erschweren. Interessanterweise zeigte die CPK23 eine Ca^{2+} -unabhängige Kinaseaktivität (Abbildung 3-16). Dies konnte bereits von Geiger et al. beobachtet werden (Geiger et al. 2010).

3.2.2 CPK23 eine Ca^{2+} -abhängige Kinase? Sequenzvergleich der CPK21 und CPK23

Die unterschiedliche Ca^{2+} -abhängige Funktionalität der CPK21 und CPK23 führt, trotz ihres sehr hohen Prozentsatzes identischer Aminosäuren (82 % Identität), zu der Frage nach möglichen relevanten Sequenzunterschieden. In der Literatur konnten die Notwendigkeit der Ca^{2+} -Bindung an die EF-Hände und die Interaktion der CLD mit dem Pseudosubstratsegment für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung gezeigt werden (Harmon et al. 1994; Harper et al. 1994; Zhao et al. 1994; Vitart et al. 2000; Rutschmann et al. 2002; Christodoulou et al. 2004; Franz et al. 2011). Das Verständnis der Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderungen wurde in den letzten Jahren durch Analysen der Sekundär- und Tertiärstruktur von CDPKs oder einzelnen Unterdomänen vertieft (Christodoulou et al. 2004; Chandran et al. 2006; Ojo et al. 2010; Wernimont et al. 2010; Wernimont et al. 2011). In NMR- oder Röntgenkristallstruktur-Analysen wurden die unterschiedlichen intramolekularen Interaktionen in der Ca^{2+} -gebundenen und -ungebundenen Form untersucht (Christodoulou et al. 2004; Chandran et al. 2006; Wernimont et al. 2010; Wernimont et al. 2011). Die Strukturanalysen und die Analysen von Punktmutanten ermöglichen die Identifizierung von Aminosäuren, die für die Ca^{2+} -Bindung und die Interaktion der CDPK-Domänen funktionell sind (Zhao et al. 1994; Vitart et al. 2000; Chandran et al. 2006; Ojo et al. 2010; Wernimont et al. 2010; Franz et al. 2011; Wernimont et al. 2011). In dieser Arbeit wird, aufgrund der in der Literatur gezeigten Relevanz der CLD und des Pseudosubstratsegments, ein Sequenzvergleich zwischen der CPK23- und CPK21-CLD und des CPK23 CPK21-Pseudosubstratsegments vorgenommen.

3.2.2.1 Vergleich der calmodulinähnlichen Domäne

Der Sequenzvergleich der CPK21- und CPK23-CLD erfolgte unter Verwendung von ClustelW2 (Larkin et al. 2007; Goujon et al. 2010).

(A)
Ca²⁺-Bindeschleife Konsensussequenz (PROSITE-Dokumentation PS00018) (Sigrist et al. 2010)
D-{W}-[DNS]-{ILVFYW}-[DENSTG]-[DNQGHRK]-{GP}-[LIVMC]-[DENQSTAGC]-x(2)-[DE]

(B)

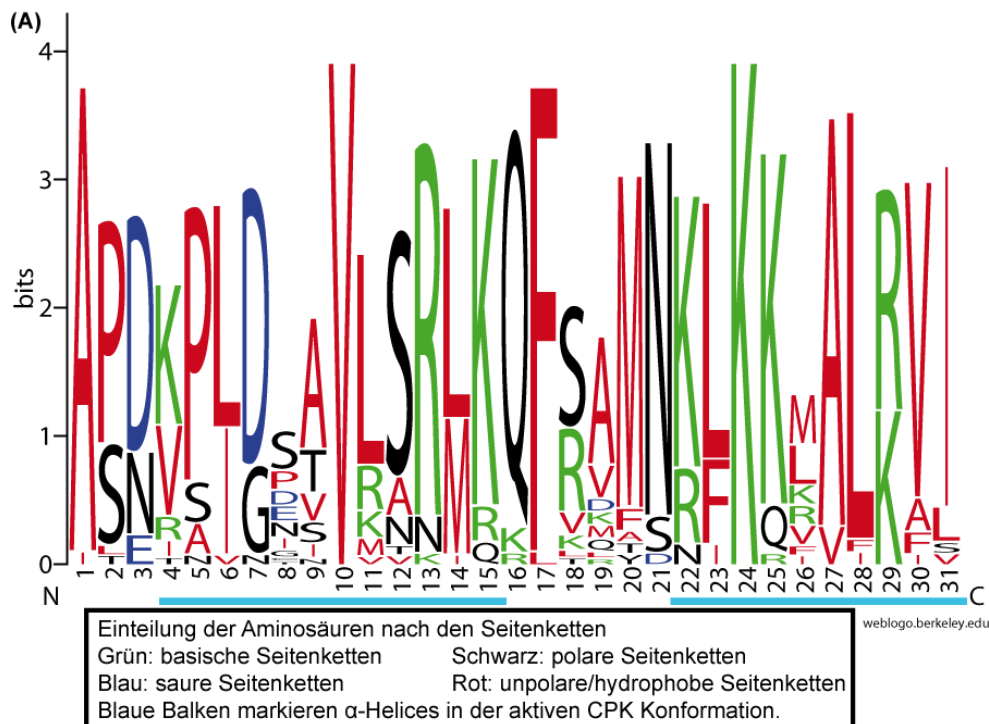
CPK23	AVSLSEEEIKGLKTLFANM <u>DTNRSGTITYE</u> QLQTGLSRLRSRLSETEVQQLVEAS <u>DVDGN</u> 60
CPK21	AVSLSEEEIKGLKTMFANI <u>DTDKSGTITYE</u> ELKTGLTRLGSRLESETEVKQLMEAA <u>DVDGN</u> 60
CPK23	<u>GTIDYEF</u> ISATMHRyklHHDEHVHKAFOHL <u>DKDKNGHITRDE</u> LESAMKEYGMGDEASIK 120
CPK21	<u>GTIDYEF</u> ISATMHRyklDRDEHVYKAFQHF <u>DKDNSGHITRDE</u> LESAMKEYGMGDEASIK 120
CPK23	EVISEV <u>DTDNDGKINFEE</u> FRAMMR <u>CGTITQPKGKQY</u> PFH 158
CPK21	EVISEV <u>DTDNDGRINFEE</u> FAMMR <u>SGSTQPOGKLL</u> PFH 158

Abbildung 3–17: Sequenzvergleich der CPK21- und CPK23-CLD unter Verwendung ClustelW2. (A) – Die Ca²⁺-Bindeschleife der EF-Hand-Konsensussequenz nach der „PROSITE-Dokumentation PS00018“ (Sigrist et al. 2010). Rot markiert die direkt an der Ca²⁺-Bindung beteiligten Aminosäuren. (B) – ClustelW2-Homologie-Vergleich der CPK21- und CPK23-CLD; identische Aminosäuren = gelb, stark homologe Aminosäuren = lila, homologe Aminosäuren = rot. Die Ca²⁺-Bindesequenz der EF-Hände ist kursiv, fett und unterstrichen.

Der Sequenzvergleich zeigt für die untersuchten CLDs eine hohe Identität in der Aminosäuresequenz (Abbildung 3-17). Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuren der Ca²⁺-Bindeschleife in EF-Hand 1 zeigt sich, dass bei zwölf Aminosäuren drei Unterschiede auftreten (Abbildung 3-17). Zwei dieser Aminosäuren sind direkt an der Ca²⁺-Bindung durch negativ geladene Seitengruppen (Positionen 3 und 12, Abschnitt 1.2.2.1) beteiligt. Die Aminosäure an der Position 12 trägt zur Ca²⁺-Bindung im EF-Hand-Motiv zwei negative Ladungen bei, weswegen Glutaminsäure stark konserviert ist (Grabarek 2006; Gifford et al. 2007). Glutaminsäure tritt mit einer Häufigkeit von 92 % an der EF-Hand-Position 12 auf (Gifford et al. 2007). Die Position 12 der EF-Hand 1 der CPK23 kann zur Bindung positiver Ionen mit Glutamin nur eine negative Ladung beitragen. Daher entspricht diese Ca²⁺-Bindeschleife nicht dem EF-Hand-Konsensusmotiv. Aus der Literatur sind viele solcher degenerierten EF-Hand-Motive bekannt, für die gezeigt werden konnte, dass Glutamin in der Position 12 zu einer Reduktion der Ca²⁺-Affinität führt (Maune et al. 1992; Gao et al. 1993; Zhao et al. 1994; Miyawaki et al. 1997; Schulze et al. 2011). So konnte auch in der Röntgenstrukturanalyse der *Pf*CDPK3 mit einem entsprechenden degenerierten Ca²⁺-EF-Hand-1-Bindemotiv in dieser EF-Hand kein gebundenes Ca²⁺ detektiert werden (Wernimont et al. 2011). Bei den anderen beiden CPK23-CPK21-Unterschieden in der Ca²⁺-Bindeschleife in EF-Hand 1 handelt es sich um verbreitete Variationen der Ca²⁺-Bindeschleife des EF-Hand-Konsensusmotivs. Auf diese beiden Aminosäurevariationen wird daher im Folgenden nicht weiter eingegangen.

3.2.2.2 Vergleich des Pseudosubstratsegments

Das Pseudosubstratsegment ist in der CDPK-Proteinfamilie konserviert. Zur Analyse des CPK23-Pseudosubstratsegments wurden die entsprechenden 31 Aminosäuren aller 34 Arabidopsis-CDPKs verglichen. Dies erfolgte einmal durch ein „Alignement“ und einmal durch Erstellung eines „sequence logos“ mithilfe von „WebLogo“ (Schneider und Stephens 1990; Crooks et al. 2004). Das erstellte „sequence logos“ ist eine grafische Darstellung der Aminosäuresequenz des Pseudosubstratsegments auf Basis aller 34 in *A. thaliana*, Ökotyp Col-0, vorkommenden CDPKs. Für jede der 31 Aminosäurepositionen des Pseudosubstratsegments werden alle vorkommenden Aminosäuren als Stapel aufgelistet. Die Höhe des Stapels ist eine grafische Darstellung der Sequenzkonserviertheit (Schneider und Stephens 1990; Crooks et al. 2004). Die Höhe einer Aminosäure in einem Stapel gibt ihre relative Häufigkeit auf der betrachteten Position an (Schneider und Stephens 1990; Crooks et al. 2004).



(B)

	CPK1	CPK2	CPK3	CPK4	CPK5	CPK6	CPK7	CPK8	CPK9	CPK10	CPK11	CPK12	CPK13	CPK14	CPK15	CPK16	CPK17	CPK18	CPK19	CPK20	CPK21	CPK22	CPK23	CPK24	CPK25	CPK26	CPK27	CPK28	CPK29	CPK30	CPK31	CPK32	CPK33	CPK34
	APDKPLDSAVLSRMKQFSAMNFKKMLALRVI	APDKPLDSAVLSRMKQFSAMNFKKMLALRVI	ASDKPLDNAVLSRMKQFRAMNKLKKMALKVI	APDKPLDPAVLSRLKQFSQMNKIKKMLALRVI	APDRALDPAVLSRLKQFSAMNKLKKMALKVI	APDRALDPAVLSRLKQFSAMNKLKKMALKVI	APNVS LGETVKARLKQFSVMNKLKKRALRVI	APNVS LGETVKARLKQFSVMNKLKKRALRVI	ASDKPIDS AVLSRMKQFRAMNKLKKLALKVI	APNVPLGDIVRSRLKQFSMMNRFKKKVLRLVI	APDKPLDPAVLSRLKQFSQMNKIKKMLALRVI	APDKPLDCAVVSRLKKFSAMNKLKKMALKVI	APNVPLGDVVKSRLKQFSVMNRFKRKALRVI	ASNVS LGETVRRARLKQFSVMNKLKKRALRVI	APDKPIDS AVLSRMKQFRAMNKLKKLALKVI	ASEIPIDISV LNNMRQFVKFSRLKQFALRAL	APDVPLDNAVMSRLKQFKAMNRFKKVALRVI	ASEVPIDISV LNNMRQFVKFSRLKQIALRAL	ASDKPIDS AVLSRMKQLRAMNKLKKLAFKFI	ALDKPLDS AVLSRLQQFSAMNKLKKIAIKVI	APDKPIDS AVLSRMKQFRAMNKLKKLALKVI	APDKPIDNVVLSRMKQFRAMNKLKKLALKVI	APEKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKKLAKVS	APNVNLGDNVRTKIQQFLLMNRFKKKVLRIV	APDTPLDTTVLSRLKKFSATDKLKKMALRVI	APDRALDPAVLSRLKQFSAMNKLQMALRVI	ASDKPIDGVVLSRLKRFDRANKFKKVLFKFI	ATDIPVDISV LNNLRQFVRYSLKQFALRAL	ISDKPINS AVLVLMKQFRAMNKLKKLALKVI	APNVPLGDIVRSRLKQFSMMNRLKKKALRVI	ASDKPIDGVVLSRLKQFRDMNKLKKVALKVI	APNVS LGETVRRARLKQFTVMNKLKKRALRVI	ASDKPIDS AVLSRMKQFRAMNKLKKLALKVI	APDVPLDNAVMSRLKQFKAMNRFKKVALRVI

Abbildung 3–18: Sequencevergleich des CDPK Pseudosubstratsegments.

(A) – „Sequence logos“ des Pseudosubstratsegments der 34 *A. thaliana*-CDPKs vom Ökotyp Col-0, mithilfe von WebLogo erstellt. Die in der aktiven Konformation an der Bildung einer α -Helix beteiligten Aminosäuren sind durch blaue Balken markiert. Für die hintere α -Helix konnte eine Funktion bei der Stabilisierung der aktiven Konformation nachgewiesen werden. (B) – Allignment des Pseudosubstratsegments der 34 *A. thaliana*-CDPKs und der ersten fünf Aminosäuren der CLD. Die Aminosäuren des Pseudosubstratsegments sind grafisch durch ein Leerzeichen von den CLD-Aminosäuren getrennt. Ziffern über der Sequenz geben die relative Position der Aminosäure im Pseudosubstratsegment an und stimmen mit der Nummerierung des „Sequence logos“ (A) überein.

Beim Vergleich der 31 Aminosäuren des Pseudosubstratsegments fallen in allen 34 CDPKs konservierte Aminosäuren auf (23–100 % Identität und 42–100 % Ähnlichkeit [Cheng *et al.* 2002]). Bei den 31 Aminosäuren des Pseudosubstratsegments der CPK21 und CPK23 konnten nur drei Unterschiede festgestellt werden. Bei den ersten beiden Abweichungen handelt es sich um Glutaminsäure (CPK23) an Position 3 im Segment zu Asparaginsäure (CPK21) und Threonin (CPK23) an Position 9 in dem zu Alanin (CPK21) (Abbildung 3-18, [B]). Glutaminsäure und Asparaginsäure sind homologe Aminosäuren mit einer sauren Seitenkette, wohingegen sich Threonin und Alanin in ihren polaren/unpolaren Seitengruppen unterscheiden. Bei der Betrachtung des erstellten „sequence logos“ fällt auf, dass die CPK21-Sequenz die häufigsten Aminosäuren für diese Positionen aufweist (Abbildung 3-18, [A]). Die in der CPK23 vorkommende Glutaminsäure an Position 3 und Threonin an Position 9 kommen aber auch mit einer gewissen Frequenz vor (Abbildung 3-18, [A]). So konnten außer für CPK23 Glutaminsäure an Position 3 des Pseudosubstratsegments in CPK16 und CPK18 sowie Threonin an Position 9 des Pseudosubstratsegments in CPK7, CPK8, CPK14, CPK25 und CPK32 beobachtet werden. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Unterschiede hauptsächlich für die geringe Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPK23-Kinaseaktivität verantwortlich sind. Der dritte Unterschied, Serin (CPK23) Position 31, Isoleuzin (CPK21), hingegen markiert eine Aminosäure, die nur in der CPK23 vorkommt. Das Isoleuzin an Position 31 des Pseudosubstratsegments scheint konserviert zu sein, da es in 31 der 34 *At*CPKs vorhanden ist, und auch im „sequence logos“ zeigt sich grafisch die große Häufigkeit von Isoleuzin an Position 31 (Abbildung 3-18, [A]). Außer der CPK23 bilden die CPK28 mit Valin sowie CPK16, CPK18 und CPK24 mit Leucin Ausnahmen. Valin und Leucin weisen aber, im Gegensatz zu Serin, dem Isoleuzin biochemisch sehr ähnliche Eigenschaften auf. Des Weiteren konnte in Untersuchungen mit der CPK1 gezeigt werden, dass dieses Isoleuzin Teil einer amphipathischen α -Helix darstellt, die in der Ca^{2+} -gebundenen Form mit einer hydrophoben Spalte der C-terminalen EF-Hände interagiert (Chandran *et al.* 2006). Diese amphipathische α -Helix umfasst, in Röntgenkristallstrukturanalysen gezeigt, neben einem Bereich des Pseudosubstratsegments fünf Aminosäuren der CLD, die in Abbildung 3-18 (B) mit angegeben sind (Wernimont *et al.* 2010). Eine weitere Untersuchung verwendete eine CPK1-Doppelmutante, bei der die letzten beiden Aminosäuren des CPK1-Pseudosubstratsegments, Valin und Isoleuzin, zu Alanin mutiert wurden (Vitart *et al.* 2000). In dieser Analyse konnten eine deutlich reduzierte Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität und bei der Untersuchung einer verkürzten Mutante ohne CLD eine Reduktion der Transaktivierung durch Calmodulin gezeigt werden (Vitart *et al.* 2000). Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion des Isoleuzins bei der Stabilisierung der Ca^{2+} -gebundenen aktiven Konformation der CPKs durch Interaktion mit der C-terminalen EF-Hand-Schleife hin.

3.2.3 In dieser Arbeit verwendete CPK21- und CPK23-Chimären und Punktmutationskonstrukte

Aufgrund in den beiden vorangegangenen Abschnitten dargelegter Erkenntnisse über die CLD und das Pseudosubstratsegment wurden CPK23-Punktmutanten ausgewählt, für die Ca^{2+} -abhängige Aktivität wichtiger Aminosäuren generiert. So wurde die -Z-Position der CPK23EF-Hand 1 von Glutamin zu Glutaminsäure mutiert. Dadurch wird das Konsensus-EF-Hand-Motiv restauriert. Des Weiteren wurde die letzte Aminosäure des Pseudosubstratsegments zur konservierten Aminosäure Isoleuzin mutiert. Ferner sollte zur Untersuchung des Einflusses der CLD auf den Ca^{2+} -bedingten Aktivitätsunterschied der CPK23 zur CPK21 eine CPK23-Chimäre mit einer CPK21-CLD generiert werden. Zur Analyse kombinatorischer Effekte wurde auch eine CPK23:21-CLD-Chimäre mit Isoleuzin als letzter Aminosäure des Pseudosubstratsegments analysiert. Die Klonierung der CPK23-EF-Hand-1-Q393E-Mutante erfolgte unter meiner Betreuung durch eine Masterstudentin (Klara Altintoprak). Die native CPK23 und das CPK23:21-CLD-Chimäre wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Dietmar Geiger (AG Prof. Dr. Rainer Hedrich). Diese CPK23-Enzym-Varianten wurden zur biochemischen Charakterisierung mit N-terminalen GST- und C-terminalen His-Tags als rekombinante Proteine in *E. coli* hergestellt und anschließend isoliert.

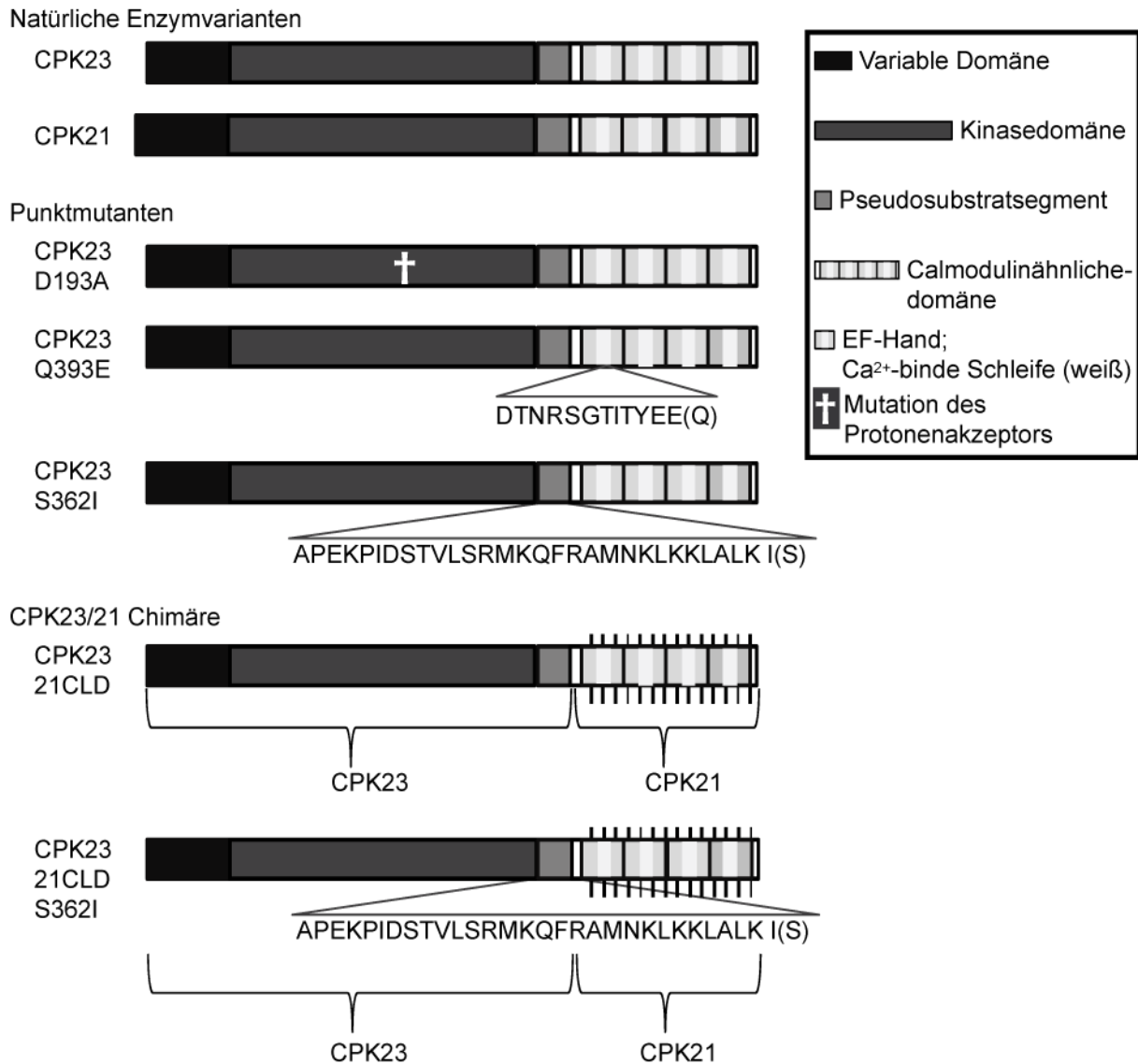


Abbildung 3–19: In den biochemischen Untersuchungen verwendete Konstrukte.

CPK21 und CPK23 sind die nativen Varianten, wohingegen CPK23D193A († markiert die mutierte Aminosäure) durch Mutation des Protonenakzeptors der ATP-Bindestelle eine kinaseinaktive Variante darstellt. Des Weiteren sind Mutanten mit einer erwarteten höheren Ca²⁺-Affinität aufgrund veränderter Ca²⁺-Bindung, CPK23Q393E- oder CPK23:21-CLD-Chimären und Mutanten mit möglicher höherer Ca²⁺-Abhängigkeit der Kinaseaktivität durch Stabilisierung der Interaktion zwischen dem Pseudosubstrat und der CLD (CPK23S362I) abgebildet. Bei den Punktmutanten ist bei angegebener Aminosäuresequenz die Aminosäure in Klammern die in der nativen Variante vorkommende. Außenschraffur markiert in den Chimären die aus der CPK21 stammenden Proteinbereiche.

3.2.4 Ca²⁺-abhängige Kinaseaktivität-CPK23::21-CLD-Chimäre und Punktmutanten in der EF-Hand 1 und dem Pseudosubstratsegment

Die in Abschnitt 3.2.3 generierten Konstrukte sowie CPK23 und CPK23D193A wurden im Kinaseaktivitätstest *in vitro* mit dem N-Terminus von SLAC1 als Substrat bezüglich der Ca²⁺-abhängigen Aktivität untersucht. Dabei wurde die Ca²⁺-abhängige Kinaseaktivität der CPK23, CPK23Q393E, CPK23S362I und CPK23:21-CLD-S362I-Chimäre untersucht.

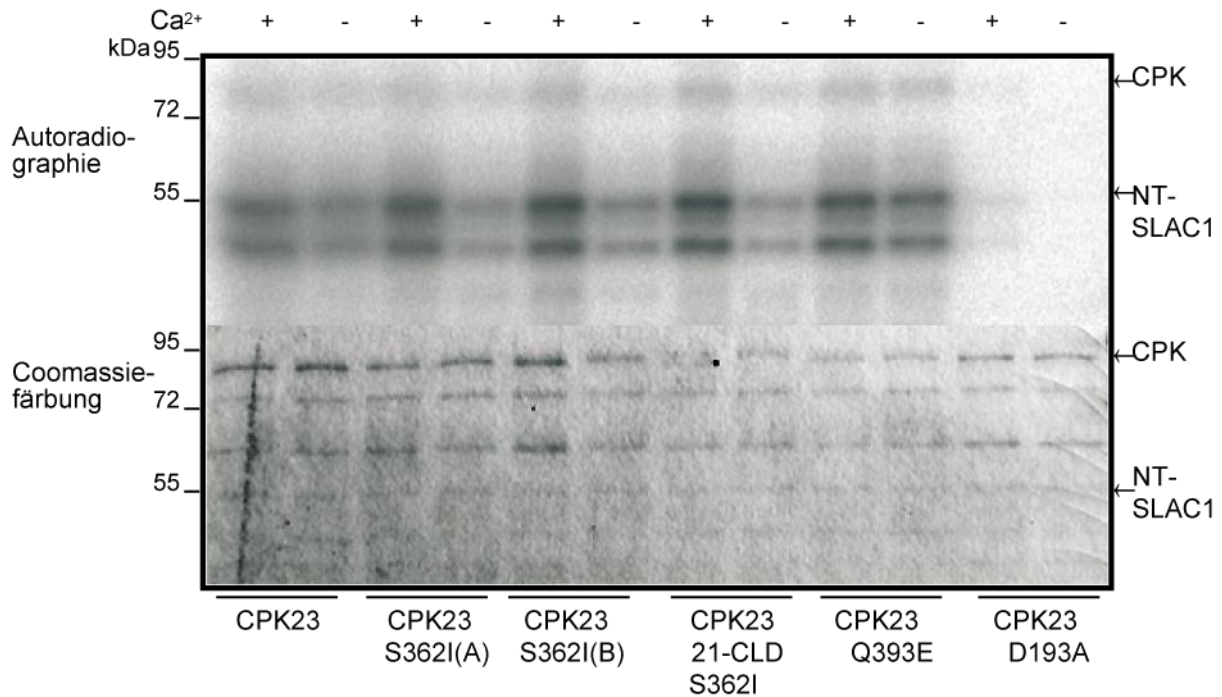


Abbildung 3–20: Untersuchung der Ca²⁺-abhängigen Kinaseaktivität der CPK23 und CPK23-Varianten mit veränderter Ca²⁺-abhängiger Kinaseaktivität mit NT-SLAC1 als Substrat.

Dies umfasst Varianten mit Punktmutationen in der Pseudosubstrat-/Autoinhibitor-Domäne (S362I) oder der EF-Hand 1 (Q393E) und Chimäre der CPK23 und CPK21 mit Punktmutation in der Pseudosubstrat-/Autoinhibitor-Domäne (21-CLD-S362I). Die Kinasen wurden in *E. coli* als GST-Fusionsprotein überexprimiert, und die Aufreinigung erfolgte mithilfe von Affinitätschromatografie. Die Aktivitätstests erfolgten mit dem GST-markierten N-Terminus von SLAC1 als Substrat und 4 μ M freiem Ca²⁺ (+) oder 5 mM EGTA (-); Autoradiografie (obere Zeile) des im SDS-Gel aufgetrennten Kinasetests und Nachweis der Proteinmenge durch Coomassie-Färbung (untere Zeile).

Außer für die kinaseinaktive Variante CPK23D193A konnte für alle untersuchten Varianten eine deutliche Aktivität beobachtet werden (Abbildung 3-20). Die Analyse erfolgte bei der Betrachtung der NT-SLAC1-Bande. Deutliche Unterschiede konnten aber in der Ca²⁺-abhängigen Aktivität beobachtet werden; so zeigte das native Konstrukt eine sehr schwache Ca²⁺-Abhängigkeit (Abbildung 3-20). Beide Punktmutanten, CPK23Q393E und CPK23S362I, wiesen eine im Gegensatz zum CPK23-Wildtyp erhöhte Ca²⁺-abhängige Induktion der Kinaseaktivität auf (Abbildung 3-20), wobei die Punktmutation im Pseudosubstratsegment einen stärkeren Einfluss auf die Ca²⁺-Abhängigkeit der Kinaseaktivität aufwies. Für die CPK23:21-CLD-Chimäre mit Punktmutation im Pseudosubstratsegment (CPK23:21-CLD-S362I) konnte im Vergleich zu den anderen untersuchten CPK23-Varianten eine stärkere Ca²⁺-Abhängigkeit der Kinaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 3-20). Dies deutet darauf hin, dass die Ca²⁺-abhängige Regulierung der Kinaseaktivität durch den Austausch der Ca²⁺-regulatorischen Domäne (CLD) und die Annäherung an das CPK21-Pseudosubstratsegment erhöht werden kann. Genauere Untersuchungen erfolgten unter Verwendung eines SLAC1.1-Peptids und ansteigenden Ca²⁺-Konzentrationen.

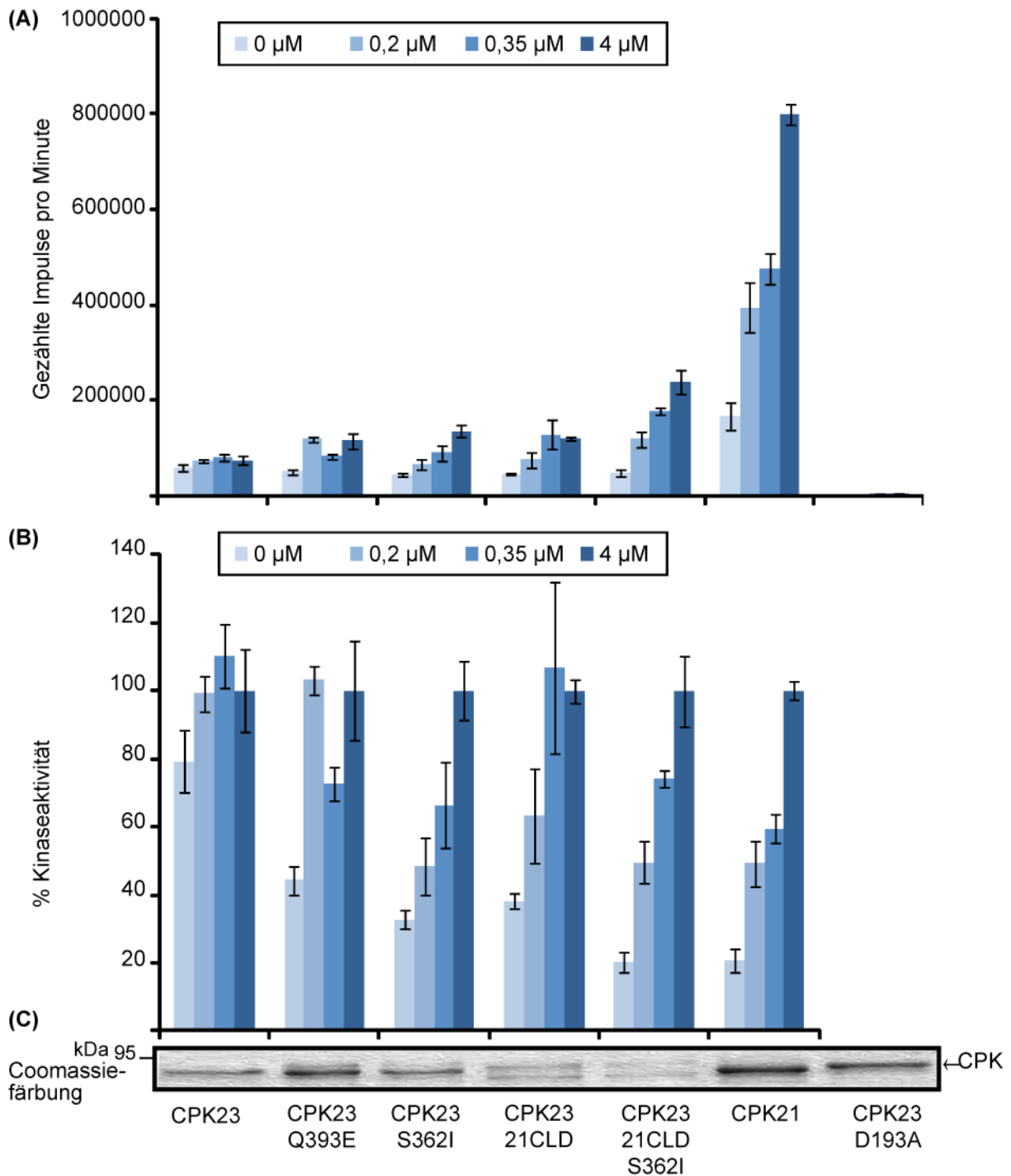


Abbildung 3–21: Analyse der Ca^{2+} -abhängigen Kinaseaktivität der CPK23 und CPK21 im Vergleich sowie CPK23-Varianten mit veränderter Ca^{2+} -abhängiger Kinaseaktivität und SLAC1.1 als Substrat. Dies umfasst Varianten mit Punktmutationen in der Pseudosubstrat-/Autoinhibitor-Domäne (S362I) oder der EF-Hand 1 (Q393E) und die Chimäre der CPK23 und CPK21 (21-CLD) mit oder ohne Punktmutation in der Pseudosubstrat-/Autoinhibitor-Domäne (21-CLD-S362I). Die Kinasen wurden in *E. coli* als GST-Fusionsprotein überexprimiert, und die Aufreinigung erfolgte mithilfe von Affinitätschromatografie. (A) – Die Aktivitätstests erfolgten mit SLAC1.1 als Substrat und vier verschiedenen Konzentrationen von freiem Ca^{2+} (0 μM , 0,2 μM , 0,35 μM , 4 μM). Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelwerten und die Standardabweichung als Fehlerbalken. (B) – Zur Beurteilung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kinaseaktivität wurde die Kinaseaktivität auf die Aktivität bei 4 μM freiem Ca^{2+} normalisiert; diese Aktivität entspricht 100 %. (C) – Nachweis der in der Aktivitätsmessung eingesetzten Proteinmengen mithilfe von Coomassie-Färbung. Die Chimären-21-CLD-Proteine zeigen eine Doppelbande auf, auf die in Abschnitt 3.2.6 genauer eingegangen wird.

In Übereinstimmung mit dem in Abbildung 3-20 dargestellten Kinaseaktivitätsmessungen konnte auch unter veränderten experimentellen Bedingungen für alle Varianten außer der kinaseinaktiven Variante CPK23D193A eine Aktivität beobachtet werden (Abbildung 3-21). Erneut konnten aber in der Ca^{2+} -abhängigen Aktivität Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 3-21). Die CPK23:21-CLD-Chimäre zeigte eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kinaseaktivität, wenn auch im Vergleich zur nativen CPK21 in geringerem Maße (Abbildung 3-21). Interessanterweise zeigte die Punktmutation in EF-Hand 1 (CPK23Q393E) eine im Gegensatz zum CPK23-Wildtyp erhöhte Ca^{2+} -abhängige Induktion der Kinaseaktivität. Dies deutet auf eine erhöhte Ca^{2+} -Affinität der EF-Hand 1 hin, verursacht durch die Punktmutation (Abbildung 3-21). Im direkten Vergleich zwischen der CPK23Q393E und der CPK23:21-CLD-Chimäre wird für das chimäre Konstrukt eine stärkere Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kinaseaktivität beobachtet (Abbildung 3-21). Daher wird angenommen, dass das Glutamin an Position 12 in der Ca^{2+} -Bindeschleife der EF-Hand 1 der CPK23 zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die postulierte geringere Ca^{2+} -Affinität der CPK23-CLD ist. Die Position 12 in der EF-Hand-1- Ca^{2+} -Bindeschleife stellt vermutlich nicht den einzigen wichtigen Sequenzunterschied bezüglich der veränderten Ca^{2+} -Affinität der CPK23-CLD dar. Auch die Mutation des Serins als letzter Aminosäure im Pseudosubstratsegment zum in Pflanzen-CDPKs konservierten Isoleuzin hat einen deutlich positiven Einfluss auf die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kinaseaktivität (Abbildung 3-21). Dies könnte einen Hinweis auf die oben entwickelte Hypothese der Störung einer für die stabile Konformation notwendigen, hydrophoben Interaktionstasche durch diese polare Aminosäure darstellen (Abschnitt 3.2.2.2). Bei der Betrachtung der CPK23:21-CLD, die zusätzlich die konservierte Aminosäure Isoleuzin am Ende des Pseudosubstratsegments aufweist (CPK23:21-CLD-S362I), kann in Näherung eine mit der CPK21 vergleichbare Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität beobachtet werden. Zusammengefasst konnte für alle in der Aminosäuresequenz identifizierten Kandidaten für eine mögliche Störung der Ca^{2+} -abhängigen Kinaseaktivität ein Einfluss auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivität *in vitro* gezeigt werden.

3.2.5 Untersuchung des Ca^{2+} -abhängigen Laufverhaltens in der SDS-Gelelektrophorese

In der Literatur wurde eine Ca^{2+} -abhängige Veränderung des Laufverhaltens im SDS-Gel von CDPKs wiederholt beschrieben (Harmon et al. 1987; Roberts und Harmon 1992; Yoon et al. 1999; Romeis et al. 2000). Auch für die CPK21 konnte eine Ca^{2+} -induzierte Veränderung der Migration im Polyacrylamid-SDS-Gel beobachtet werden (Franz et al. 2011) (Abbildung 3-22). Konträr dazu zeigte die CPK23 im SDS-Gel keinen Unterschied im Migrationsverhalten mit oder ohne Ca^{2+} (Dissertation Sandra Franz 2008; Abbildung 3-23). Zum besseren Verständnis des Mechanismus des unterschiedlichen Migrationsverhaltens

bei CDPKs wird ein möglicher Einfluss der Kinaseaktivität auf das Ca^{2+} -abhängige Laufverhalten untersucht.

3.2.5.1 Analyse des Ca^{2+} -abhängigen Laufverhaltens im SDS-Gel einer CPK21-inaktiven Variante und der CPK21-CLD

Zur Untersuchung der Funktion der Kinaseaktivität im Ca^{2+} -abhängigen Migrationsverhalten wurde der Einfluss von Ca^{2+} auf das Laufverhalten einer inaktiven Variante, der CPK21D204A, und der Ca^{2+} -bindenden Domäne der CPK21 untersucht.

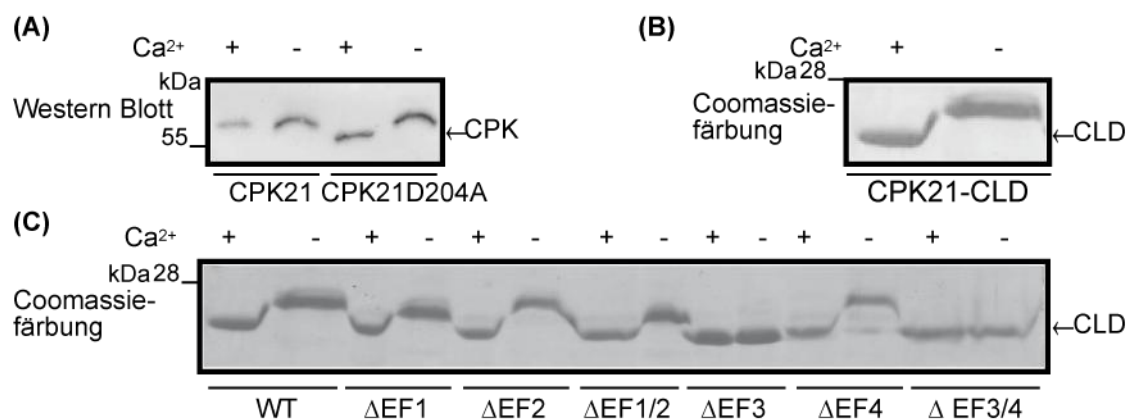


Abbildung 3–22: Der Einfluss von Ca^{2+} auf das Laufverhalten im SDS-Gel (A) der CPK21 und einer kinaseinaktiven Variante CPK21D204A (B) der Ca^{2+} -bindenden Domäne (CLD) der CPK21 und (C) der CPK21-CLD-Varianten mit degenerierten EF-Hand-Motiven. Die Proteine wurden über 10 % (A) oder 15 % (B und C) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt; der SDS-Probenpuffer enthielt 2 mM Ca^{2+} (+) oder 5 mM EGTA (-). (A) – Die CPK21 und CPK21D204A wurden transient in *N. benthamiana* als Strep-II-markiertes Fusionsprotein exprimiert und über Affinitätschromatografie aufgereinigt, die Proteindetektion erfolgte über Strep-AP-Konjugat. (B und C) – Die CPK21-CLD wurde aus *E. coli* über HIS-Markierung isoliert und mithilfe von Coomassie-Färbung nachgewiesen. (B) – Die mutierten EF-Hand-Varianten wurden mit Δ und der Nummer der mutierten EF-Hand bezeichnet. Die eingeführten Mutationen führten zum Austausch zweier Aminosäuren in der Ca^{2+} -Bindeschleife des EF-Hand-Motivs. Der Aminosäureaustausch erfolgt auf Positionen 1 und 3 der Ca^{2+} -Bindeschleife des EF-Hand-Motivs (D zu A) und unterbindet die Ca^{2+} -Bindung an der EF-Hand. (B) stellt einen Ausschnitt aus (C) dar.

Für die inaktive Variante und die CPK21-CLD konnte analog zum nativen Enzym im SDS-Gel mit Ca^{2+} eine schnellere Migration als unter Bedingungen ohne Ca^{2+} (5 mM EGTA) beobachtet werden (Abbildung 3-22). Bei der Untersuchung der CPK21-CLD-Varianten mit mutierten EF-Hand-Motiven fällt auf, dass die CPK21-CLD- ΔEF3 und die Doppelmutante CPK21-CLD- $\Delta\text{EF3/4}$ keine Ca^{2+} -abhängige Änderung des Laufverhaltens zeigen (Abbildung 3-22). Für die entsprechenden EF-Hand-Varianten des CPK21-Gesamtenzym konnte analog für alle Varianten außer für die ΔEF3 - und die C-terminale EF-Hand-Doppelmutante ein Ca^{2+} -abhängiges Migrationsverhalten gezeigt werden (Franz et al. 2011). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das unterschiedliche Migrationsverhalten im SDS-Polyacrylamidgel für die CPK21 durch eine Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung, unabhängig von der Kinaseaktivität, hervorgerufen wird, wobei diese vermutlich auf eine von

der CLD induzierte Strukturänderung zurückzuführen ist, da diese Domäne alleine ein ähnliches Ca^{2+} -abhängiges Laufverhalten zeigt.

3.2.5.2 Untersuchung des Ca^{2+} -abhängigen Laufverhaltens im SDS-Gel der CPK23:21-CLD-Chimäre

Die in Abschnitt 3.2.2.1 dargelegte Hypothese einer durch Ca^{2+} über Bindung an die CLD-induzierten Konformationsänderung führte zur Untersuchung des Ca^{2+} -abhängigen Laufverhaltens der CPK23:21-CLD-Chimäre.

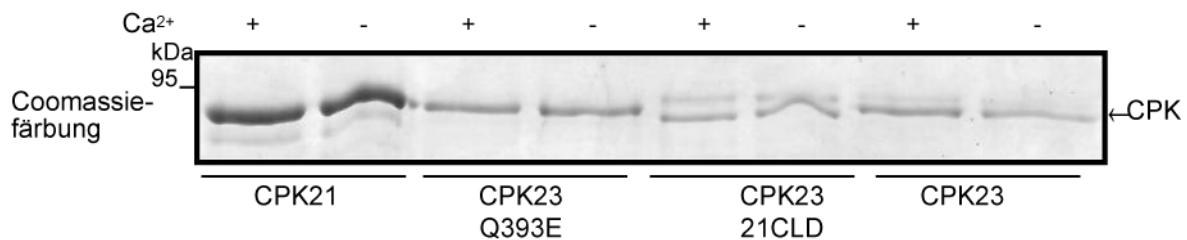


Abbildung 3–23: Der Einfluss von Ca^{2+} auf das Laufverhalten im SDS-Gel der CPK21, CPK23, CPK23:21-CLD und CPK23-Q393E.

Die Proteine wurden mithilfe von 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der SDS-Probenpuffer enthielt 2 mM Ca^{2+} (+) oder 10 mM EGTA (-). Die CPKs wurden transient in *E. coli* als GST-markierte Fusionsproteine exprimiert und über Affinitätschromatografie isoliert. Der Proteinnachweis erfolgte durch Coomassie-Färbung.

Die Untersuchung des Einflusses von Ca^{2+} auf das Laufverhalten im SDS-Gel der CPK23:21-CLD-Chimäre zeigte, dass die CPK23-Kinase mit den Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften der CPK21 (CPK23:21-CLD) ein mit der CPK21 vergleichbares Ca^{2+} -abhängiges Migrationsverhalten aufweist (Abbildung 3-23). Des Weiteren wurde auch die Punktmutante Q393E untersucht. Die CPK23Q393E zeigte wie die CPK23 keine Ca^{2+} -abhängige Veränderung des Migrationsverhaltens (Abbildung 3-23). Untersuchungen unterschiedlicher EF-Hand-Mutanten der CPK21 ergaben, dass die Ca^{2+} -Bindeeigenschaften der C-terminalen und nicht der N-terminalen EF-Hände für das Laufverhalten entscheidend sind (Franz et al. 2011). In diesem Zusammenhang kann das Laufverhalten der CPK23Q393E erklärt werden. Die Untersuchung ergab für die CPK23:21-CLD-Chimäre ein dem der CPK21 ähnliches Ca^{2+} -abhängiges Laufverhalten im SDS-Gel. Dies könnte auf eine veränderte Ca^{2+} -abhängige Konformation der Chimäre hindeuten.

3.2.6 Untersuchung des (Auto-) Phosphorylierungszustands in *E.coli*-exprimierten CPK23-Varianten

Einige (Auto-) Phosphorylierungsstellen von CDPKs wurden in massenspektrometrischen Analysen, entweder gezielt für CDPKs oder in Untersuchungen, die ganze Teile des Pflanzen-Phosphoproteoms betrachteten, identifiziert (Nühse et al. 2004; Hegeman et al. 2006; de la Fuente van Bentem et al. 2008; Witte et al. 2010). Bei keiner der

Untersuchungen wurde die CPK23 verwendet. In der Literatur wurde eine Änderung des Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel für phosphorylierte Kinase beschrieben (Bögge et al. 1988; Romeis et al. 2001; Witte et al. 2010). Für viele der hier verwendeten CPK23-Varianten konnte eine zweite Proteinbande mit scheinbar höherem Molekulargewicht beobachtet werden (Abbildung 3-24, untere Zeile). Interessanterweise zeigen nicht alle CPK23-Varianten in gleichem Maße diese zweite Proteinbande (Abbildung 3-24, untere Zeile). Dies führt zu der Frage, ob die aus *E. coli* gewonnenen Varianten unterschiedlich (auto-) phosphoryliert sind. Zur Analyse, ob es sich bei den langsamer migrierenden Banden um phosphorylierte Proteine handelt, wurden für die CPK23-Punktmutanten S362I und Q393E sowie für die CPK21-Chimäre mit der S362I-Mutation „ProQ[®] Diamond“ verwendet. Als Vergleich und zur Kontrolle dienten die native CPK23 und die inaktive Variante CPK23D193A.

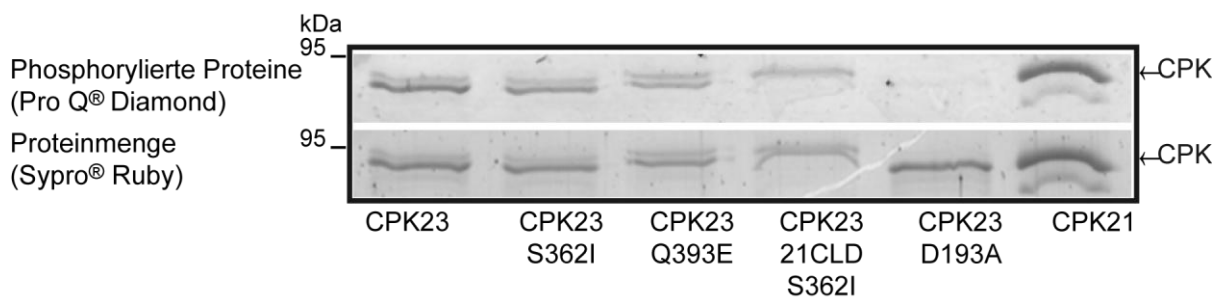


Abbildung 3–24: Analyse der Autophosphorylierung verschiedener CPK23-Varianten. In *E. coli*-exprimierte, GST-markierte CPKs wurden über GST-Affinitätschromatografie aufgereinigt und über 10 % SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die obere Zeile zeigt den Nachweis der phosphorylierten CPK mithilfe von „ProQ[®] Diamond“-Färbung, während die untere Zeile die Proteinmengenkontrolle mithilfe von „Sypro[®] Ruby“-Färbung darstellt.

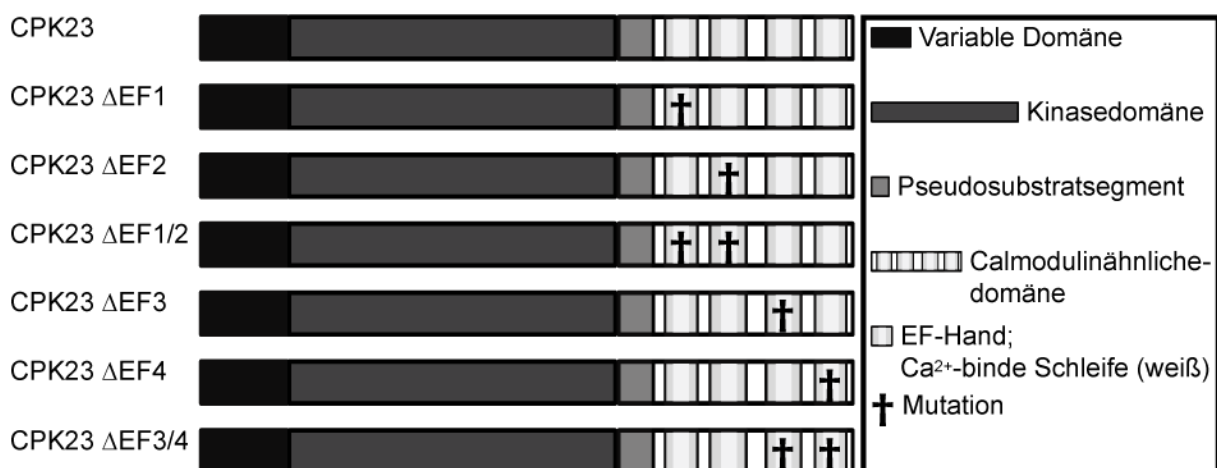
Beim Vergleich der kinaseinaktiven Variante CPK23D193A mit den anderen Punktmutanten, den Chimären und den nativen Enzymvarianten fällt auf, dass alle Migrationsbanden außer der CPK23D193A als „ProQ[®] Diamond“-Signal erkennbar waren (Abbildung 3-24). Dies deutet auf eine Phosphorylierung aller Migrationsbanden hin. Da die inaktive CPK kein Signal in der „ProQ[®] Diamond“-Färbung zeigte, kann eine Autophosphorylierung angenommen werden. Bei der Betrachtung des Migrationsverhaltens konnte für die CPK23D193A ein scheinbar geringeres Molekulargewicht als für die anderen untersuchten Proteine beobachtet werden; dies deutet auch darauf hin, dass die unteren Banden der anderen Enzymvarianten bereits eine Phosphorylierung aufweisen (Abbildung 3-24). Beim Vergleich der aktiven CPKs zeigten sich Unterschiede im Migrationsverhalten und dem Intensitätsverhältnis der Banden untereinander; dies deutet auf differenzielle Phosphorylierungen der Proteine hin (Abbildung 3-24). Hegemann et al. konnten bei der Analyse von Autophosphorylierungsstellen in CDPKs zwischen einer und sechs verschiedene phosphorylierte Stellen pro Protein identifizieren (Hegeman et al. 2006). Auch bei der CPK23 könnten in dieser Analyse mehr als zwei Autophosphorylierungsstellen

differenziell phosphoryliert sein, obwohl nur zwei unterscheidbare Banden detektiert wurden. Das zwischen den CPK23-Varianten unterschiedliche Bandenmuster deutet auf unterschiedliche Phosphorylierungsstellen hin. Neben diesen können auch gleiche Phosphorylierungsstellen auftreten. Am wahrscheinlichsten ist eine Mischung aus gleichen und unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen. Dieses Ergebnis deutet auf einen möglichen Einfluss von Phosphorylierungen auf die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität der *E.coli*-exprimierten Kinasen hin und konnte in einem zweiten Versuch bestätigt werden.

3.2.7 Analyse der CPK23-Varianten mit degenerierten EF-Hand-Motiven

Aufgrund der Ca^{2+} -unabhängigen Kinaseaktivität der CPK23 wurde die Funktionalität der EF-Hand-Motive für die Kinaseaktivität untersucht. Zur Untersuchung dieser Problematik wurden verschiedene CPK23-EF-Hand-Varianten, mit funktionslosen EF-Hände-Motiven, erzeugt. Diese Konstrukte wiesen auf Positionen 1 und 3 des Konsensus-EF-Hand- Ca^{2+} -Bindeschleifen-Motivs ein Alanin statt einer Asparaginsäure oder eines Asparagins auf (in der Einleitung die Ca^{2+} -Bindeschleife von EF-Hand-Motiven). Diese unterschiedlich mutierten CPK23-Versionen sind in Abbildung 3-25 im Überblick dargestellt. Die Herstellung der Konstrukte und die Analyse erfolgten unter Betreuung und in Zusammenarbeit mit einer Masterstudentin (Klara Altintoprak). Für die CPK21 konnte mit den entsprechenden analogen Punktmutationsvarianten die unterschiedliche Funktionalität der EF-Hände für die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität untersucht werden (Franz et al. 2011).

(A)



(B)

EF1 DTNRSGTITYEQ	Δ EF1 ATARSGTITYEQ
EF2 DVDGNGTIDYYE	Δ EF2 AVAGNGTIDYYE
EF3 DKDKNGHITRDE	Δ EF3 AKAKNGHITRDE
EF4 DTDNDGKINFEE	Δ EF4 ATANDGKINFEE

Abbildung 3–25: In den biochemischen Untersuchungen verwendete EF-Hand-Mutanten mit degenerierten EF-Hand-Motiven.

(A)-CPK23 stellt die native Variante dar, wohingegen mutierte EF-Hand-Varianten mit Δ und der Nummer der mutierten EF-Hand bezeichnet wurden. Grafische Markierung der mutierten EF-Hand durch ein Kreuz (\dagger). (B) – Die eingeführten Mutationen führten zum Austausch zweier Aminosäuren in der Ca^{2+} -Bindeschleife des EF-Hand-Motivs. Dargestellt sind die Aminosäuresequenz der nativen Ca^{2+} -Bindeschleife des EF-Hand-Motivs für die EF-Hand 1–4 (linke Spalte) und die mutierte Variante $\Delta\text{EF1}-\Delta\text{EF4}$ (rechte Spalte). Der Aminosäureaustausch erfolgt an Positionen 1 und 3 der Ca^{2+} -Bindeschleife des EF-Hand-Motivs (D oder N zu A). Die ausgetauschten Aminosäuren sind kursiv.

Die EF-Hand-Mutanten wurden im *in vitro* Kinasetest untersucht.

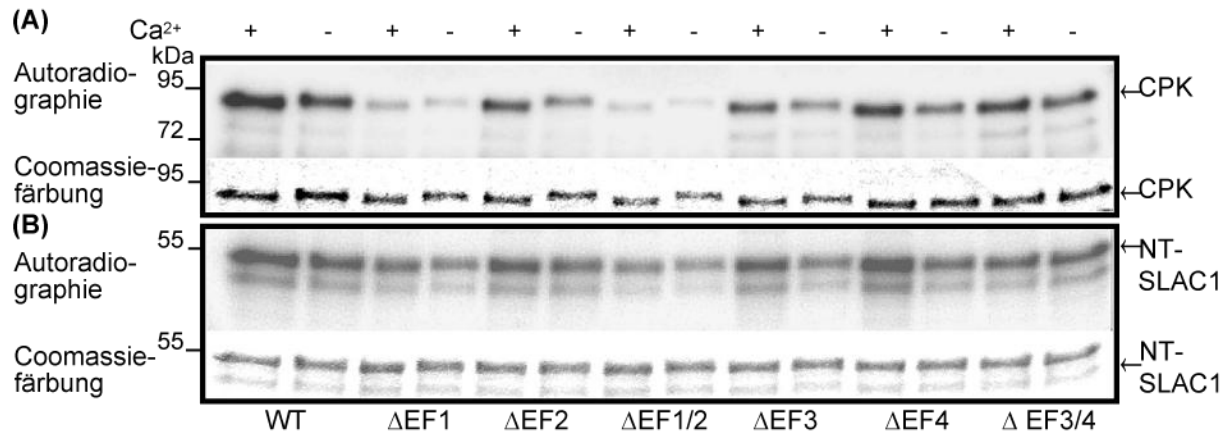


Abbildung 3–26: Untersuchung des Einflusses der einzelnen EF-Hände auf die Kinaseaktivität. Die GST-Fusionsproteine wurden aus *E. coli* isoliert und über Affinitätschromatografie aufgereinigt. Als Substrat wurde der N-Terminus von SLAC1 verwendet; der Ansatz enthielt entweder 4 μM freies Ca^{2+} (+) oder 5 mM EGTA (-). (A und B) – Autoradiografie des im SDS-Gel aufgetrennten Kinasetests. (A) – Autoradiografie der Autophosphorylierung (obere Zeile) und Nachweis der Proteinmenge durch Coomassie-Färbung (untere Zeile). (B) – Analyse der SLAC1-NT-Phosphorylierung mithilfe von Radiografie (obere Zeile) und Nachweis der Proteinmenge durch Coomassie-Färbung (untere Zeile).

Beim Vergleich der Autophosphorylierung an der CPK selbst und der Trans-Phosphorylierung an NT-SLAC1 fällt auf, dass die Trans-Phosphorylierung der Autophosphorylierung ähnelt (Abbildung 3-26). So können beim Vergleich der EF-Hände miteinander für beide Phosphorylierungsereignisse ähnliche Aktivitätsunterschiede beobachtet werden. Die folgenden, sich auf Abbildung 3-26 beziehenden Ausführungen charakterisieren Abbildungsteile (A) und (B) in gleichem Maße. Alle Mutanten zeigen, in sehr unterschiedlicher Ausprägung, eine vom WT abweichende Kinaseaktivität. Zum Beispiel zeigt die ΔEF1 -Mutante eine geringere Kinaseaktivität, wohingegen die anderen EF-Hand-Einzelmutanten nur zu einer schwachen Reduktion der Kinaseaktivität führen. Dieser Unterschied wird auch bei einer CPK23-Variante ohne funktionelle N-terminale EF-Hände $\Delta\text{EF1/2}$ deutlich. Diese ähnelt in ihrer Aktivität ΔEF1 , wohingegen die zweite Mutation nur reduziert einen Einfluss auf die Aktivität zu haben scheint. Interessanterweise scheint gerade die EF-Hand mit dem degenerierten Ca^{2+} -Bindemotiv ΔEF1 den deutlichsten Einfluss auf die Kinasefunktion der CPK23 aufzuweisen. Des Weiteren konnte für die C-terminalen EF-Hand-Einzelmutanten ein leichte Ca^{2+} -Abhängigkeit beobachtet werden. Die entsprechende Doppelmutante $\Delta\text{EF3/4}$ zeigte eine Ca^{2+} -unabhängige Kinaseaktivität mit einer mit den C-

terminalen Einzelmutanten ohne freies Ca^{2+} vergleichbaren Signalintensität. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden.

3.2.8 Ca^{2+} -abhängige intramolekulare Interaktion zwischen dem Pseudosubstratsegment und der CLD der CPK21

Die zweite α -Helix des Pseudosubstratsegments CH1_2 konnte als Ca^{2+} -abhängige, CLD-interagierende Sequenz identifiziert werden (Vitart et al. 2000). In Röntgenkristallstrukturanalysen der CLD mit CH1_2 der CPK1 konnte gezeigt werden, dass CH1_2 eine amphipathische α -Helix darstellt, die in der Ca^{2+} -gebundenen Form mit einer hydrophoben Spalte der C-terminalen EF-Hände interagiert (Chandran et al. 2006). 2010 gelang es für verschiedene Protisten-CDPKs und die Ca^{2+} -regulatorische Domäne des Pseudosubstratsegments gemeinsam mit der CLD, Röntgenkristallstrukturdaten zu veröffentlichen (Wernimont et al. 2010; Wernimont et al. 2011). Wernimont et al. (2011) beschrieben die Bindung der CH1_2 an die CLD wie folgt: Die CH1_2 befindet sich im Griff der Handfläche der C-terminalen EF-Hand-Schleife und im Handrücken der N-terminalen EF-Hand-Schleife. Die N-terminale EF-Hand-Schleife ist im Vergleich zu Calmodulin um 180° gedreht, sodass die hydrophobe Oberfläche der N-terminalen EF-Hand-Schleife nicht mit CH1_2 interagiert (Wernimont et al. 2011). Diese Interaktion zwischen CH1_2 und der CLD sollte im Rahmen dieser Arbeit weiter gehend untersucht werden. Hierbei wurden die CLD und CH1_2 der CPK21 verwendet, da die CPK21 eine deutliche Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität aufwies. Des Weiteren sollten Mutanten der C- und N-terminalen EF-Hand-Schleifen verwendet werden, um Hinweise auf den Einfluss der EF-Hand-Schleifen auf die Interaktion zu erhalten. Die Interaktion wurde mithilfe der „Surface Plasmon Resonance“- (SPR-) Technologie untersucht. CH1_2 (Ligand) wurde auf der Chipoberfläche immobilisiert und die Interaktion bei verschiedenen CLD-Varianten (Analyt) und -Konzentrationen gemessen.

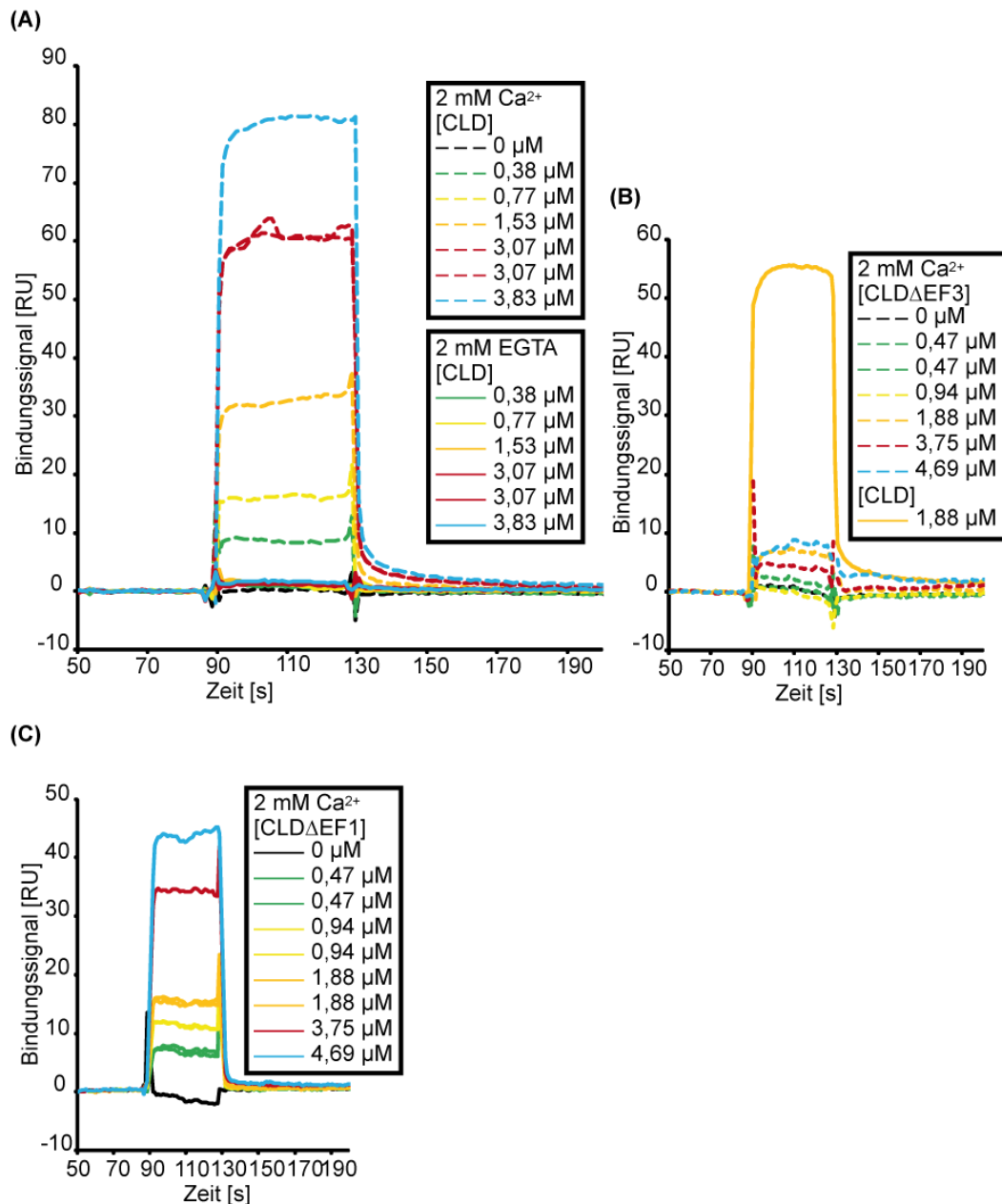


Abbildung 3–27: Interaktionstest der CLD mit der CH1_2-Helix der CPK21 mit der SPR-Technologie unter Verwendung eines „Biacore 3000“.

Das als Ligand verwendete CPK21-Pseudosubstratsegment-Peptid 21P1 entspricht der Sequenz AMNKLK₁LALKVI und stellt einen Teil des CPK21- Pseudosubstratsegments dar. Der in 21P1 unterstrichene Bereich stellt die CH1_2-Helix dar (Abschnitt 1.2.2.2). Dieses Peptid wurde auf der Chip-Oberfläche immobilisiert. Die Hintergrundkorrektur erfolgte mit einer Leerzelle. (A) – Interaktionstest der CLD mit 21P1 mit ansteigenden CLD-Konzentrationen mit 2 mM Ca^{2+} oder 2 mM EGTA (B) – Interaktionstest der CLD- ΔEF3 mit dem 21P1 mit ansteigenden CLD-Konzentrationen in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} (C) – Interaktionstest der CLD- ΔEF1 mit dem CLD-bindenden 21P1 mit ansteigenden CLD-Konzentrationen in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} .

Eine Interaktion zwischen der CLD- und der CH1_2-Helix konnte mithilfe von SPR-Technologie nachgewiesen werden (Abbildung 3-27). Diese Interaktion war abhängig von Ca^{2+} . Bei EGTA-Zugabe konnte auch bei hohen CLD-Konzentrationen keine Interaktion beobachtet werden (Abbildung 3-27, [A]). Bei der Betrachtung der CLD- ΔEF1 konnte eine Reduktion der Interaktion im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 3-27,

[C]). Diese Reduktion war aber nicht so deutlich wie bei der CLD- Δ EF3-Mutante (Abbildung 3-27, [B]). Bei der CLD- Δ EF3 war die gemessene Interaktion teilweise außerhalb des messbaren Bereichs (Abbildung 3-27). Das Interaktionssignal stieg auch nicht im gesamten Messbereich mit Zunahme der CLD-Konzentration an (Abbildung 3-27). Auch wenn eine degenerierte EF-Hand immer zu einer Reduktion der Interaktion führt, deuten diese Ergebnisse auf eine wichtigere Funktion der EF-Hand 3 als die der EF-Hand 1 für die Interaktion hin. Dies könnte durch die Annahme erklärt werden, dass die Interaktion der CH1_2 mit der C-terminalen EF-Hand-Schleife erfolgt. In diesem Modell wäre für die Interaktion eine korrekt geformte Ca^{2+} -gebundene Konformation der C-terminalen EF-Hände wichtiger als der N-terminalen. Die Reduktion in der CLD- Δ EF1 könnte auf den Einfluss auf die Gesamtkonformation der CLD zurückzuführen sein, auch wenn die N-terminalen EF-Hände nicht direkt an der Interaktion beteiligt sind. Bei der Interaktion der CLD mit CH1_2 konnte eine für eine Interaktion charakteristische Assoziation beobachtet werden, aber keine charakteristische Dissoziation. Die Interaktion ist bei fehlender Zugabe der CLD (bei 130 Sekunden Austausch von Puffer mit CLD gegen Puffer ohne CLD) sofort nicht mehr messbar. Dies ist vermutlich auf fehlende die Interaktion stabilisierende Komponenten wie z. B. die CH1_1-Helix zurückzuführen.

4 Diskussion

4.1 Aktivierung von CDPKs in Abhängigkeit von Ca^{2+}

4.1.1 Ist CPK23 eine Ca^{2+} -abhängige Kinase?

Beim Vergleich der Kinaseaktivität der CPK23 und CPK21 im Bezug auf ihre Ca^{2+} -Abhängigkeit, zeigten sich deutliche Unterschiede. So wies die CPK21 eine eindeutige Ca^{2+} -Abhängigkeit, die CPK23 dagegen keine eindeutige Ca^{2+} -Abhängigkeit in ihrer Kinaseaktivität auf (Abbildungen 3-16, 3-21). Dies stimmt mit der bisher publizierten Literatur überein (Geiger et al. 2010). Auch in den von Geiger et al. veröffentlichten Untersuchungen konnte bei der CPK23 nur eine sehr schwache und bei der CPK21 eine ausgeprägte Ca^{2+} -Abhängigkeit beobachtet werden. Aufgrund der großen Homologie der beiden Kinasen wurde versucht, Unterschiede in der biochemischen Aktivität mit Unterschieden in der Aminosäuresequenz zu korrelieren. Hierbei lag der Fokus auf der CLD und dem Pseudosubstratsegment, da diese Proteinbereiche für die Ca^{2+} -Regulierung zuständig sind. Des Weiteren wurden zur Beurteilung der Relevanz möglicher Sequenzunterschiede neben den Sequenzvergleichen auch publizierte Strukturdaten und Mutageneseanalysen verwendet.

4.1.1.1 Die Ca^{2+} -Bindemotive der CPK23

In einem ersten Schritt wurde die Ca^{2+} -Bindedomäne der CPK23 und der CPK21 verglichen. Die Analyse fokussierte auf die an der Ca^{2+} -Bindung beteiligten Ca^{2+} -Bindeschleifen, für die in Mutageneseanalysen und Strukturdaten eine entscheidende Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung gezeigt werden konnte (Zhao et al. 1994; Franz et al. 2011; Schulze et al. 2011; Wernimont et al. 2011).

4.1.1.2 Die EF-Hand 1 als Ca^{2+} -Bindemotiv in der CPK23

Die EF-Hand- Ca^{2+} -Bindeschleifen der CPK23 wurden mit der EF-Hand- Ca^{2+} -Bindeschleifen-Konsensussequenz verglichen. Es fällt auf, dass die CPK23-EF-Hand 1 keine Konsensussequenz- Ca^{2+} -Bindeschleifen aufweist (Abbildung 3-17). Genauer befindet sich in der CPK23-EF-Hand-1- Ca^{2+} -Bindeschleife an Position 12 keine Glutaminsäure, sondern Glutamin. Dies ist besonders interessant, da an der Ca^{2+} -Bindung zwei negative Ladungen dieser Position beteiligt sind. Auch wurde diese Position 12 mit der Ca^{2+} -Selektivität in Verbindung gebracht (Gifford et al. 2007). In Ca^{2+} -selektiven EF-Händen konnte die saure Aminosäure auf Position 12 nur die Konformation für zwei Sauerstoffionen-Bindungen mit Ca^{2+} einnehmen. Wenn in der EF-Hand 1 der CPK23 nur eine negative Ladung auf Position 12 vorhanden ist, stellt sich die Frage, inwieweit die CPK23-EF-Hand 1 selektiv Ca^{2+} bindet. Eine CPK23-Aminosäureaustausch-Punktmutante mit Glutaminsäure an Position 12 der EF-

Hand-1-Ca²⁺-Bindeschleife wurde in Kinaseaktivitätsmessungen verwendet. Diese Mutante (CPK23Q393E) wies im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Ca²⁺-Abhängigkeit bezüglich der Kinaseaktivität auf (Abbildungen 3-20 und 3-21), was die CPK23-Aminosäure Q393 als einen für die Ca²⁺-Abhängigkeit wichtigen Unterschied zwischen der CPK23 und der CPK21 bestätigt. Auch konnten für eine homologe CDPK aus *Landsberg erecta* mit demselben EF-Hand-1-Ca²⁺-Bindemotiv durch Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Messungen nur drei Ca²⁺-Bindestellen bestimmt werden (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Erwin Grill). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine fehlende Ca²⁺-Bindung an EF-Hand 1 hin.

In der Literatur konnten mehrere solcher Ca²⁺-Bindeschleifen beschrieben werden. Zum Beispiel wurde die CLD mit dem Pseudosubstratsegment von *Plasmodium falciparum* PfCDPK3, die in der EF-Hand 1 auch ein Glutamin an Position 12 aufweist, in der Kristallstruktur untersucht (Wernimont et al. 2011). Nach Bindung von Ca²⁺ an die EF-Hände 2, 3 und 4 konnte eine aktive Konformation der EF-Hand 1, die keine Ionen gebunden hatte, beobachtet werden (Wernimont et al. 2011). Die aktive Konformation wird vermutlich durch die aktive Konformation der Ca²⁺-gebundenen EF-Hand 2 induziert. Die Ca²⁺-Bindeschleife der EF-Hand 1 ohne Ionenbindung wird durch Wasserbrücken stabilisiert, an denen auch das Glutamin auf Position 12 beteiligt ist (Wernimont et al. 2011). Für eine PfCDPK-Variante mit einer Punktmutation auf EF-Hand-1-Position 12 von Glutaminsäure zu Glutamin konnte das Ausbleiben einer Ca²⁺-Bindung an diese EF-Hand nachgewiesen werden (Zhao et al. 1994). Diese Mutante zeigte eine dramatisch reduzierte Ca²⁺-abhängige Kinaseaktivität und Konformationsänderung (Zhao et al. 1994).

Von den 34 *A. thaliana*-CDPKs konnten acht mit mindestens einer EF-Hand-Ca²⁺-Bindeschleife identifiziert werden, die nicht der Konsensussequenz entsprachen. Mit Ausnahme der CPK25, die keine C-terminalen EF-Hände, dafür aber zwei nichtkonsensuelle N-terminale EF-Hände aufweist, treten die untypischen EF-Hände paarweise mit voll funktionsfähigen EF-Händen auf. Zum Beispiel enthält die CPK13 zwar zwei untypische EF-Hand-Motive (EF 2, 3), die aber paarweise mit funktionsfähigen EF-Händen (EF 1, 4) auftreten, was eine aktive Konformation dieser untypischen EF-Hände durch die Partner-EF-Hand ermöglichen könnte. In sechs der CPK-Isoformen mit ungewöhnlichen EF-Hand-Ca²⁺-Bindeschleifen ist die EF-Hand 1 betroffen. Aber nur für die CPK23 konnte keine Aminosäure mit einer sauren Seitenkette an der Position 12 beobachtet werden. Bei der Analyse der EF-Hand 1 der CPK23 fällt auf, dass die CPK23-EF-Hand 1 an Position 3, im Gegensatz zur CPK21, Asparagin und keine Asparaginsäure aufweist. Beide Aminosäuren können durch ihre polare Seitenkette die Ca²⁺-Bindung stabilisieren. Auch stellt dieser Unterschied eine mit der Konsensussequenz übereinstimmende Variation des EF-Hand-Motivs dar. Nach dem Modell der elektrostatischen Abstoßung nach Falke ist diese Variation jedoch sehr interessant (Abschnitt 1.2.2.1.2). Dieses Modell der elektrostatischen Abstoßung geht davon

aus, dass Ca^{2+} durch seinen größeren Ionenradius als Mg^{2+} eher stabilisierend bezüglich der vielen negativen Seitenketten in der EF-Hand-Schleife wirken kann und daher mit Präferenz gebunden wird. Die Unterschiede zwischen der CPK23 und der CPK21 in der EF-Hand-1- Ca^{2+} -Bindeschleife an Position 3 und Position 12 reduzieren die Anzahl negativer Ladungen in der CPK23-EF-Hand-1- Ca^{2+} -Bindeschleife, was die Bindung eines Kations mit einem kleineren Ionenradius begünstigen könnte. Die Bindeeigenschaften von Mg^{2+} , die eine Unterscheidung zu Ca^{2+} ermöglichen, sind

- Mg^{2+} benötigt sechs Liganden in einer octahedralen Geometrie (Gifford et al. 2007; Nara und Tanokura 2008).
- Mg^{2+} hat einen kleineren Ionenradius (Gifford et al. 2007).

Ein mögliches Modell wäre daher die Bindung von Mg^{2+} an die CPK23-EF-Hand 1. Diese Annahme einer Mg^{2+} -Bindung an die CPK23-EF-Hand 1 erfolgt erstens aufgrund der reduzierten Dichte negativer Ladungen in der CPK23-EF-Hand-1- Ca^{2+} -Bindeschleife und zweitens dadurch, dass Position 12 nur eine, nicht zwei negative Ladungen zur Ca^{2+} -Bindung beisteuern kann. Dies könnte besonders bezüglich der hohen Konzentration von freiem Mg^{2+} (0,5–2,0 mM) in den Zellen ein interessantes Modell darstellen. Aber auch eine „aktive“ Konformation wie für die CLD der *Pf*CDPK3 mit einer EF-Hand-1- Ca^{2+} -Bindeschleife ohne Ca^{2+} -Bindung könnte ein Erklärungsmodell liefern, das eine Stabilisierung der Ca^{2+} -Bindeschleife durch Wasserbrückenbindungen unter Beteiligung des Glutamins an Position 12 voraussetzen würde.

4.1.1.3 CPK23-CLD

Es stellt sich die Frage, ob neben EF-Hand-1-Position 12 andere Unterschiede zwischen der CPK23 und der CPK21 in der CLD zur Ca^{2+} -Abhängigkeit beitragen. Zur Untersuchung dieser Frage wurde ein Chimärekonstrukt aus CPK23-N-terminaler variabler Domäne, Kinasedomäne und Pseudosubstratsegment sowie aus CPK21-CLD verwendet (Abbildung 3-19). Im Vergleich zum Wildtyp konnte eine erhöhte Ca^{2+} -Abhängigkeit für die Kinaseaktivität der CPK23:21-CLD gezeigt werden (Abbildung 3-21). Die Ca^{2+} -Abhängigkeit war noch stärker ausgeprägt als für die CPK23Q393E (Abbildung 3-21). Daher wird angenommen, dass neben Position 12 der Ca^{2+} -Bindeschleife der EF-Hand 1 noch andere Unterschiede in der CLD die Ca^{2+} -Abhängigkeit beeinflussen.

Dass die EF-Hand 1 in der CLD nicht den einzigen für die Ca^{2+} -Bindung relevanten Unterschied darstellt, zeigt sich auch für das Ca^{2+} -abhängige Migrationsverhalten im SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 3-23). Die CPK21 zeigt eine unterschiedliche Migration mit oder ohne Ca^{2+} , die CPK23 nicht. Dasselbe Ca^{2+} -abhängige Migrationsverhalten im SDS-Polyacrylamidgel für die CPK21 tritt auch bei einer inaktiven Kinasevariante und für die CLD alleine auf (Abbildung 3-22). Daher wird angenommen, dass eine von der CLD induzierte

Konformationsänderung zu diesem Phänomen führt. Mit dieser Annahme übereinstimmend, konnte für das Chimärekonstrukt CPK23:21-CLD ein mit der CPK21 übereinstimmendes Ca^{2+} -abhängiges Migrationsverhalten beobachtet werden (Abbildung 3-23). Die CPK23-EF-Hand-1-Punktmutante Q393E zeigt, wie die native CPK23, kein abweichendes Laufverhalten in Abhängigkeit von Ca^{2+} (Abbildung 3-23). Daher wird angenommen, dass die zur Ca^{2+} -abhängigen Migrationsänderung führenden Konformationsänderungen nicht mit Position 12 der Ca^{2+} -Bindeschleife der EF-Hand 1 in Verbindung stehen. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen mit CPK21-EF-Hand-Mutanten mit funktionslosen Ca^{2+} -Bindeschleifen interessant. So konnte für das CPK21-Gesamtenzym (Franz et al. 2011) und für die CLD (Abbildung 3-22) gezeigt werden, dass die Mutation der EF-Hand 3 und des C-terminalen EF-Hand-Paares zum Verlust des Ca^{2+} -abhängigen Migrationsverhaltens führt. Dies deutet auf eine wichtige Funktion der C-terminalen EF-Hände für die im SDS-Gel untersuchte Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung hin.

4.1.1.4 Funktionalität der CPK23-EF-Hände

Der Funktion der EF-Hände in der CPK23-Kinaseaktivität wurde mit EF-Hand-Mutanten untersucht. Für die CPK21 konnten in einer entsprechenden Untersuchung von 2011 Unterschiede in der Kinaseaktivität der einzelnen EF-Hand-Mutanten gemessen werden (Franz et al. 2011). Alle Mutanten der CPK21 zeigten eine deutlich geringere Kinaseaktivität als der Wildtyp, wobei sowohl N- als auch C-terminale CPK21-EF-Hand-Paar-Mutanten eine sehr geringe Aktivität aufwiesen. Interessanterweise war die Aktivität der Mutante mit einem funktionslosen N-terminalen EF-Hand-Paar am geringsten. Diese zeigte bei der Kinaseaktivitätsmessung eine Signalintensität, die mit einer inaktiven Variante vergleichbar war. Zusammengefasst konnte für alle EF-Hände der CPK21 eine Funktionalität beobachtet werden. Außerdem wurde für die N-terminalen EF-Hände im Vergleich zu den C-terminalen EF-Händen eine entscheidende Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Kinaseaktivität gerade bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationen gezeigt (Franz et al. 2011).

Im Vergleich zur CPK21 konnte für die CPK23 kein dramatischer Effekt der mutierten EF-Hände (ΔEF) auf die Kinaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 3-26), was darauf hindeutet, dass die Ca^{2+} -Bindung an die EF-Hände in der CPK23 keine notwendige Voraussetzung für die Aktivität ist, dies in Übereinstimmung mit der beobachteten Ca^{2+} -unabhängigen Kinaseaktivität der CPK23. Eine ausgeprägte Reduktion der Kinaseaktivität trat bei der EF-Hand 1 (ΔEF1) und der EF-Hand-1/2-Doppelmutante ($\Delta\text{EF1/2}$) auf, wobei die reduzierte Kinaseaktivität der EF-Hand 1 mit der EF-Hand-1/2-Doppelmutante vergleichbar schien. Daher wird angenommen, dass die geringe Aktivität der CPK23-EF-Hand 1/2 auf den Funktionsverlust der EF-Hand 1 zurückzuführen ist. Dies deutet auf eine wichtige Funktion der EF-Hand 1 bei der Kinaseaktivität der CPK23 hin. Zusammen mit den oben angestellten Überlegungen zur vermutlich fehlenden Ca^{2+} -Bindung an die EF-Hand 1 erscheint dies

überraschend, könnte aber darauf hindeuten, dass die Bindung eines anderen Kations an die EF-Hand 1 der CPK23 eine entscheidende Funktion bei der Kinaseaktivität hat. Die mutierten EF-Hand- Ca^{2+} -Bindeschleifen enthalten an Position 1 und 3 keine polare Aminosäure, sondern Alanin. Die Bindung eines Kations, wie z. B. Mg^{2+} , an mutierte EF-Hand-Motive könnte somit nicht erfolgen. Auch eine bereits aktive Konformation der EF-Hand 1 ohne Ionenbindung könnte durch Mutation der Positionen 1 und 3 in der Ca^{2+} -Bindungsschleife gestört werden. In beiden Fällen müsste von einer aktiven Konformation der EF-Hand 1 ohne Ca^{2+} -Bindung ausgegangen werden. Die mit einer aktiven Konformation der EF-Hand 1 verbundene räumliche Anordnung der EF-Hand-1-E- und -F-Helix könnte auch eine Konformationsänderung der das Pseudosubstratsegment enthaltenden CH1-Helix induzieren (Abschnitt 1.2.2.2). Diese Hypothese würde von einem Zerfall der CH1-Helix ohne Ca^{2+} -Bindung ausgehen.

Des Weiteren konnte im Vergleich zum nativen Enzym eine schwache Ca^{2+} -Abhängigkeit der EF-Hand-Mutanten 3 (ΔEF3) und 4 (ΔEF4) beobachtet werden (Abbildung 3-26). Beim derzeitigen Kenntnisstand bezüglich des Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von CDPKs kann diese Beobachtung nicht eindeutig erklärt werden. In diesem Zusammenhang könnte aber eine Beobachtung von Wernimont et al. (2010) von Interesse sein. Die Veröffentlichung zeigt, dass *in vitro* durch Entzug von Ca^{2+} nicht alle CDPKs vollständig inaktiviert werden. Ein Modell für diesen Mechanismus wäre eine Autophosphorylierung, die zu einer Restkinaseaktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} führt. Die Untersuchung des Autophosphorylierungszustands unterschiedlicher CPK23-Varianten nach Expression in *E. coli* deutet auf eine bereits in *E. coli* auftretende Kinaseaktivität hin (Abbildung 3-24). Eine mögliche Annahme wäre, dass ein die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität beeinflussendes Autophosphorylierungsereignis bereits in *E. coli* auftritt, das aber teilweise zwei funktionelle stark Ca^{2+} -affine C-terminale EF-Hände benötigt. Unter diesen Voraussetzungen könnte sich die schwache Ca^{2+} -Abhängigkeit der EF-Hand-Mutanten 3 und 4 erklären lassen. Die Autophosphorylierung würde in der C-terminalen Einzelmutante *in vitro* bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen nur nach der Ca^{2+} -Bindung an die funktionelle C-terminale EF-Hand erfolgen und damit zur partiellen Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kinaseaktivität führen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Doppelmutante des C-terminalen EF-Hand-Paares in Abwesenheit von Ca^{2+} eine mit den C-terminalen EF-Hand-Einzelmutanten vergleichbare Kinaseaktivität aufweist. Zur genaueren Untersuchung müsste der Zusammenhang zwischen der EF-Hand-Mutation der C-terminalen EF-Hände und möglichen Autophosphorylierungsstellen untersucht werden. Aufgrund der in allen C-terminalen Mutanten auftretenden hohen Ca^{2+} -unabhängigen Kinaseaktivität scheint dieser Effekt aber im Vergleich zur EF-Hand 1 oder zur CPK23:21-CLD-Chimäre von untergeordneter Bedeutung (Abbildungen 3-20, 3-21 und 3-26).

4.1.2 Pseudosubstratsegment

4.1.2.1 Pseudosubstratsegment der CPK23

Aufgrund der im Vergleich zur nativen CPK21 geringeren Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPK23:21-CLD-Chimäre wurde das Pseudosubstratsegment untersucht. Auf Grundlage der 34 *A. thaliana*-CPKs wurde ein „sequence logos“ des Pseudosubstratsegments erstellt (Abbildung 3-18). Bei der Analyse dieses „sequence logos“ mit den 31 Aminosäuren des CPK23-Pseudosubstratsegments fiel eine abweichende Aminosäure in der Sequenz der CPK23 auf. Genauer weist die CPK23 an der Position 31 des Pseudosubstratsegments ein Serin statt des stark konservierten Isoleuzins auf. Einige wenige *At*CPKs enthalten auf Position 31 des Pseudosubstratsegments eine der hydrophoben Aminosäuren Leucin oder Valin, die ähnliche biochemische Eigenschaften wie Isoleuzin besitzen. Nur die CPK23 weist an dieser Stelle ein Serin auf. Zur genaueren Untersuchung dieses Aminosäureunterschieds wurde eine Punktmutante der CPK23 gebaut, die zu einem Aminosäureaustausch führt. Diese Mutante enthält an der Position 31 des Pseudosubstratsegments die konservierte Aminosäure Isoleuzin (CPK23S362I) (Abbildung 3-19). Unter Berücksichtigung der bereits identifizierten für die Ca^{2+} -Abhängigkeit wichtigen Funktion der CLD wurde ebenso ein Konstrukt hergestellt, das die Pseudosubstratpunktmutation und die 21-CLD kombiniert. Dieses Konstrukt wurde als CPK23-21-CLDS362I bezeichnet (Abbildung 3-19). Bei der Betrachtung der Kinaseaktivität konnte bei der CPK23S362I eine deutliche Zunahme der Ca^{2+} -Abhängigkeit im Vergleich zur nativen CPK23 beobachtet werden (Abbildungen 3-20 und 3-21). Die CPK23-Variante CPK23-21-CLDS362I zeigte eine mit der CPK21 vergleichbare Ca^{2+} -Abhängigkeit (Abbildung 3-21). Daher wird angenommen, dass die fehlende Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPK23 auf den Aminosäureunterschied zwischen der CPK23 und der CPK21 im Pseudosubstratsegment in Kombination mit der CLD zurückzuführen ist.

Aufgrund der 2010 und 2011 publizierten Strukturdaten (Wernimont et al. 2010; Wernimont et al. 2011) wird angenommen, dass das Serin 362

- in der inaktiven Konformation eine Aminosäure der langen, das Pseudosubstratsegment enthaltenden α -Helix CH1 darstellt und
- in der aktiven Konformation Teil der zweiten α -Helix des Pseudosubstratsegments (CH1_2) ist.

Die sich nach der Ca^{2+} -Bindung vermutlich ausbildenden zwei Pseudosubstrathelices sind in Abbildung 3-18 mit einem blauen Balken markiert. Die erste Helix wird als CH1_1, die zweite als CH1_2 bezeichnet. Die Identifizierung der Bereiche der Helices erfolgte in dieser Arbeit aufgrund eines Sequenzvergleichs mit bereits publizierten CDPK-Struktur-Daten (Wernimont

et al. 2011). In Mutageneseuntersuchungen der CH1_2-Helix der *At*CPK1 konnte deren Relevanz für die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität gezeigt werden (Vitart et al. 2000). Eine wichtige Funktion auch der Aminosäuren 30 und 31 des CPK1-Pseudosubstratsegments (Valins und Isoleuzins) zeigte sich in Mutageneseuntersuchungen (Valin und Isoleuzin \rightarrow Alanin und Alanin) (Vitart et al. 2000). In der CPK23 befindet sich auf der Position des in den Untersuchungen von Vitart et al. mutierten Isoleuzins das bereits diskutierte Serin. Bei der Betrachtung der CH1_2-Helix fällt auf, dass diese sehr viele Aminosäuren mit basischen sowie mit hydrophoben Aminosäureseitenketten aufweist (Abbildung 3-18). In Kristallstrukturanalysen konnte für die *At*CPK1 CH1_2 die Ausbildung einer amphipathischen α -Helix gezeigt werden (Chandran et al. 2006), die eine hydrophobe Seite, aus hydrophoben Aminosäuren gebildet, und eine polare Seite, aus basischen Aminosäuren aufgebaut, enthält. Für CH1_2 konnte in der aktiven Konformation eine hydrophobe Interaktion mit der C-terminalen EF-Hand-Schleife der CLD beobachtet werden (Chandran et al. 2006; Wernimont et al. 2011). Eine solche Interaktion könnte die aktive Konformation stabilisieren. Auch in der inaktiven Konformation hat die CH1_2-Helix als Teil der CH1-Helix eine wichtige Funktion. Basische Aminosäuren des CH1_2-Helix-Bereichs bilden einen Teil der Autoinhibitorregion und interagieren mit sauren Aminosäuren der Kinasedomäne, wodurch eine für die ATP-Bindung essenzielle Glutaminsäure räumlich von der ATP-Bindestelle ferngehalten wird (Wernimont et al. 2011). In der CPK23-CH1_2-Helix kann mit Ausnahme des S362 eine der CPK1 ähnliche Häufung hydrophober und basischer Aminosäuren beobachtet werden. Daher wird auch für die CPK23 von der Ausbildung einer amphipathischen α -Helix ausgegangen. Mit den heutigen Strukturdaten kann der Einfluss des Serins 362 auf die aktive oder die inaktive Konformation nicht eindeutig vorhergesagt werden. Die Ca^{2+} -unabhängige Aktivität der CPK23 spricht jedoch für eine stabilisierende Wirkung des S362 auf eine Ca^{2+} -unabhängige aktive Konformation.

4.1.2.2 Interaktionsstudien zum Pseudosubstratsegment und zur CLD

Zur Untersuchung der postulierten Interaktion zwischen dem CLD und dem Pseudosubstratsegment wurden Interaktionsstudien durchgeführt. Dabei wurde der CH1_2-Abschnitt des Pseudosubstratsegments verwendet. Diese Untersuchungen erfolgten mit der CPK21-CH1_2- α -Helix und der CPK21-CLD, da diese Kinase eine deutliche Ca^{2+} -Abhängigkeit aufweist. Daher wird davon ausgegangen, dass die CPK21 ein gutes Modell für Ca^{2+} -abhängige, intramolekulare Interaktionen in CDPKs darstellt. Diese Untersuchungen erfolgten mit SPR-Messungen. Wie erwartet, konnte für die CLD und die CH1_2- α -Helix in Gegenwart von Ca^{2+} eine Interaktion gemessen werden, die von der Konzentration der CLD abhängig war (Abbildung 3-27, [A]). Mit EGTA konnte selbst bei hohen CLD-Konzentrationen keine Interaktion gemessen werden (Abbildung 3-27, [A]). Diese Beobachtungen stimmen mit der Annahme einer Ca^{2+} -abhängigen Interaktion überein.

Es wurde versucht, Hinweise darauf zu erhalten, welche der beiden EF-Hand-Schleifen an der Interaktion beteiligt ist. Dies geschah durch Verwendung einer N-terminalen EF-Hand-Mutante (Δ EF1) und einer C-terminalen EF-Hand-Mutante (Δ EF3). Beide Mutanten zeigten im Vergleich zur nativen CLD eine Reduktion der Interaktionsstärke (Abbildung 3-27). Für die CLD Δ EF3 konnte ein dramatischer Effekt beobachtet werden. Das gemessene Interaktionssignal korrelierte in seiner Intensität für die CLD Δ EF3 auch nicht mit der Menge der zugegebenen CLD. Daher wird davon ausgegangen, dass durch Mutation der EF-Hand 3 die Interaktion zwischen der CLD und der CH1_2-Helix zerstört wird. Für die CLD Δ EF1 war die Interaktion noch deutlich messbar. Ein ausgeprägtes strukturelles Konformationsproblem ist aufgrund der gemessenen Kinaseaktivitäten der CPK21-EF-Mutanten eher unwahrscheinlich (Franz et al. 2011). Die Annahme, dass die C-terminale EF-Hand-Schleife in der Ca^{2+} -gebundenen Form mit CH1_2 interagiert, könnte die Ergebnisse der Interaktionsstudie erklären. Bei fehlender Ca^{2+} -Bindung an der EF-Hand 3 könnte die Interaktion auch bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen verhindert werden, was zu dem drastischen Effekt der EF-Hand-3-Mutation auf die Interaktion führen würde. Die schwächer reduzierte Interaktion bei Mutation der EF-Hand 1 könnte auf den Einfluss der Mutation auf die gesamte Struktur zurückzuführen sein. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die EF-Hand 1 mit der CH1_2 interagiert. Die Interaktionsstudien unterlegen aber die postulierte wichtigere Funktion der C-terminalen EF-Hände für die Ca^{2+} -abhängige Interaktion der CLD mit der CH1_2-Helix.

Bei genauer Betrachtung der Interaktion der CLD mit CH1_2 konnte eine für eine Interaktion charakteristische Assoziation beobachtet werden, aber keine charakteristische Dissoziation. Die CLD scheint von CH1_2 nicht stabil gebunden zu werden, was auf fehlende die Interaktion stabilisierende Komponenten wie z. B. die CH1_1-Helix zurückzuführen sein könnte.

Aufgrund der in dieser Untersuchung erhaltenen Interaktionsdaten und der bereits publizierten Strukturdaten wird von einer entscheidenden Funktion der C-terminalen EF-Hände für die Ca^{2+} -abhängige Interaktion der CLD mit CH1_2 ausgegangen. Bei Kinaseaktivitätsmessungen mit CPK21-EF-Hand-Mutanten zeigte sich aber eine entscheidende Funktion der N-terminalen EF-Hände (Franz et al. 2011). Eine mögliche Erklärung sind zwei Ereignisse:

- der Zerfall von CH1 mit einer benötigten Ca^{2+} -Bindung an die N-terminalen EF-Hände als initiales, entscheidendes Ereignis zur Aktivierung der Kinase
- die Interaktion von CH1_2 mit der C-terminalen EF-Hand-Schleife als eine die aktive Konformation stabilisierende Interaktion

Vermutlich wird die Ca^{2+} -Bindung an die schwach Ca^{2+} -affinen N-terminalen EF-Hände benötigt, um eine Interaktion zwischen CH1_2 und den stark Ca^{2+} -affinen C-terminalen EF-Händen zu ermöglichen. Weiterführende Untersuchungen könnten andere EF-Hand-Mutanten einschließen, was eine genauere Untersuchung des Einflusses der EF-Hände auf die CH1_2-Interaktion ermöglichen würde. Interessant wäre auch eine vergleichbare Studie zur Interaktion mit der CPK23 bezüglich des ungewöhnlichen CPK23-Pseudosubstratsegments.

4.1.3 Regulierung der CPK23-Aktivität durch Phosphorylierung

Bisher konnte bei einigen CDPKs eine erhöhte Kinaseaktivität nach Stressbehandlung *in vivo* gemessen werden (Martín und Busconi 2001; Zhu et al. 2007; Mehlmer et al. 2010; Franz et al. 2011). Am wahrscheinlichsten ist, dass die erhöhte *in vitro* Kinaseaktivität auf eine *in vivo* (Auto-) Phosphorylierung zurückzuführen ist. Nach dem Wissensstand der Verfasserin konnte nie direkt gezeigt werden, dass stressabhängige Phosphorylierungen direkt zur Induktion der Kinaseaktivität führen. Auf die Existenz eines solchen Mechanismus deutet die Tatsache hin, dass für die *Ni*CDPK2 eine Korrelation zwischen stressabhängiger Phosphorylierung und Kinaseaktivität gezeigt werden konnte (Romeis et al. 2001). In der Literatur wurde für phosphorylierte CDPKs eine Änderung des Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel beschrieben (Bögge et al. 1988; Romeis et al. 2001; Witte et al. 2010). Bei verschiedenen in *E. coli* rekombinant exprimierten CPK23-Varianten wurden mehrere Banden mit scheinbar unterschiedlichem Molekulargewicht beobachtet (Abbildung 3-24). Mithilfe von „ProQ[®] Diamond“-Färbung konnte gezeigt werden, dass alle rekombinant exprimierten CPK23-Varianten, außer einer inaktiven Variante (CPK23D193A), nach Expression in *E. coli* autophosphoryliert sind (Abbildung 3-24). Des Weiteren konnte, außer für die CPK23D193A, keine nicht-autophosphorylierte Bande nachgewiesen werden. Aufgrund der Ergebnisse der „ProQ[®] Diamond“-Färbung und des Laufverhaltens wird von mehreren unterschiedlichen Phosphorylierungen ausgegangen. Die zwischen den CPK23-Varianten unterschiedlichen Bandenmuster deuten auf sich teilweise unterscheidende Phosphorylierungsstellen hin. Neben diesen können auch gleiche Phosphorylierungsstellen auftreten. Am wahrscheinlichsten ist eine Mischung aus gleichen und unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen. Ein Einfluss der CPK23-Autophosphorylierung der rekombinanten Proteine auf die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität kann nicht ausgeschlossen werden.

4.1.3.1 Regulierung der CPK23-Aktivität durch Phosphorylierung des Pseudosubstratsegments

Beim Vergleich des CPK23-Pseudosubstratsegments mit den Pseudosubstratsegmenten der anderen *A. thaliana*-CDPKs konnte das Serin 362 als ungewöhnliche Aminosäure identifiziert werden (Abschnitt 4.1.2.1). Auch konnte *in vitro* ein Zusammenhang zwischen dem S362 und der Ca^{2+} -unabhängigen Kinaseaktivität beobachtet werden. Wie in Abschnitt 4.1.2.1 dargelegt, wird von einem durch das S362 hervorgerufenen Konformationsunterschied zu CPKs, mit Isoleuzin auf den entsprechenden Positionen, ausgegangen. Ein phosphoryliertes Serin in der CPK23 auf Position 362 könnte als größere und negativ geladene Aminosäure ein größeres Strukturproblem als ein unphosphoryliertes Serin darstellen. Daher stellte sich die Frage, ob das untersuchte Serin 362 in der CPK23 eine mögliche Auto- oder Transphosphorylierungsstelle darstellt. Bei der Betrachtung der Serin-362-flankierenden Sequenz fiel die Häufung basischer Aminosäuren auf (Abbildung 3-18). Viele identifizierte Phosphorylierungs-Motive für CDPKs weisen eine hohe Anzahl basischer Aminosäuren auf (Harper und Harmon 2005). Ungeachtet dessen stellt die serinflankierende Sequenz kein bereits identifiziertes CDPK-Phosphorylierungs-Motiv dar (Harper und Harmon 2005). In der Literatur wurden jedoch von den bekannten Motiven abweichende CDPK-Phosphorylierungs-Stellen beschrieben (Hegeman et al. 2006). In einer homologen CDPK aus *Landsberg erecta* konnte *in vitro* das entsprechende Serin als Autophosphorylierungsstelle identifiziert werden (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Erwin Grill). Dies könnte auf einen Regulierungsmechanismus der CPK23-Aktivität hindeuten, der mithilfe von Phosphorylierung des Serins 362 die Ca^{2+} -abhängige Kinaseaktivität kontrolliert. In den Analysen des Autophosphorylierungszustands (Abschnitt 4.1.3) der CPK23-Varianten aus *E. coli* konnte kein Zusammenhang zwischen Phosphorylierungsbanden und dem S362 hergestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass möglicherweise mehrere Phosphorylierungsstellen in der CPK23 unterschiedlich phosphoryliert sind. Eine genauere Analyse müsste mit einer Methode erfolgen, die es ermöglicht, Phosphorylierungsstellen zu bestimmen, z. B. unter Verwendung massenspektrometrischer Messungen. Die Interaktion zwischen einer homologen CDPK aus *Landsberg erecta* und der ABA-abhängigen Phosphatase ABI2 zeigte eine mögliche ABA-abhängige Regulierung der CPK23-Kinaseaktivität auf (Abschnitt 4.2.6.1). Dies ist interessant, da die CPK23 in dieser Arbeit als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion beschrieben wurde (Abschnitt 4.2.4.1). Zusammengefasst erscheint dieses Serin als mögliche Phosphorylierungsstelle von großem Interesse.

4.2 CPK21 und CPK23 als Regulatoren der abiotischen Stress-Signaltransduktion

4.2.1 Funktionalität eines Resttranskripts in den Linien *cpk21-1* und *cpk23-1*

In den Analysen der *in vivo* Funktion der *CPK21* wurde die Mutanten-Linie *cpk21-1* (SALK_029412) untersucht, da

- der T-DNA-Insertionsort im ersten Exon lokalisiert wurde und strangabwärts kein Transkript nachgewiesen werden konnte,
- die Transkription und Translation vor der Insertionsstelle zu einem 51 Aminosäuren langen N-terminalen CPK21-Peptid führen würden,
- dieses Restpeptid einen Teil der N-terminalen variablen Domäne umfasst und weder als Kinase noch als Ca^{2+} -Bindeprotein funktionell sein kann,
- mit einem Promoter-*pCPK21::CPK21*-Konstrukt der Phänotyp der *cpk21-1* komplementiert werden konnte.

Für die Linie *cpk23-1* (SALK_007958) wurde die Insertionsstelle im siebten Exon lokalisiert. Auch konnte mithilfe von RT-PCR ein T-DNA enthaltendes *CPK23*-Transkript nachgewiesen werden. Da kein Antikörper gegen die CPK23 vorhanden war, konnte die Entstehung eines CPK23-Proteins nicht überprüft werden. Aber aufgrund der RT-Daten kann die Entstehung einer verkürzten CPK23-Variante nicht ausgeschlossen werden. In der Proteinsequenz befindet sich der T-DNA-Insertionsort in der E-Helix der dritten EF-Hand. Daher umfasst die verkürzte CPK23-Kinase den N-Terminus und die Kinasedomäne, das Pseudosubstratsegment und das N-terminale EF-Hand-Paar. Es wird angenommen, dass die *cpk23-1* eine verminderte CPK23-Funktion aufweist, da

- die *cpk23-1* in phänotypischen Untersuchungen bei Ma und Wu (2007) einen der Überexpressionslinie konträren Phänotyp zeigt,
- die *cpk23-1* eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte RCAR1-abhängige *pRD29B::LUC*-Expression aufweist, aber eine transiente Überexpression zu einer Reduktion der RCAR1-abhängigen *pRD29B::LUC*-Expression führt (Abschnitt 4.2.4.1),
- bezüglich der CPK23-Funktion als Aktivators des Anionenkanals SLAC1 (Abschnitt 4.2.6.2) in den Stomata der *cpk23-1* ein deutlich reduzierter Anionenstrom gemessen wurde.

Funktionell könnte eine Reduktion der CPK23-Aktivität in der *cpk23-1* durch vermehrten Abbau der die T-DNA enthaltenden RNA zustande kommen. Sollte ein verkürztes CPK23-

Protein gebildet werden, so könnte dieses eine geringere Kinaseaktivität als das native Protein aufweisen. In dieser Arbeit wird ein Modell diskutiert, in dem die C-terminalen EF-Hände durch Interaktion mit der CH1_2-Helix zur Stabilisierung der aktiven Konformation führen (Abschnitt 4.1.2.2). Beim Fehlen der C-terminalen EF-Hände könnte diese stabilisierende intramolekulare Interaktion nicht auftreten, was zu einer Destabilisierung der aktiven Konformation führen könnte. Eine solche verkürzte CDPK würde dann eine reduzierte Aktivität aufweisen.

4.2.2 *cpk21-1* zeigt eine erhöhte Toleranz gegenüber osmotischem Stress

Die *CPK21*-Funktion bei langfristiger osmotischer Stressadaptation wurde phänotypisch untersucht, und zwar durch Anzucht auf Medien, die als osmotisch aktive Substanzen PEG, Mannitol oder NaCl enthielten. Für die *cpk21-1* konnte bei 300 mM Mannitol eine erhöhte Toleranz gegenüber hyperosmotischem Stress im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Abbildung 3-4). Unter der 300 mM Mannitol enthaltenden Anzuchtbedingung konnte mithilfe des Logit-Modells ein signifikanter Unterschied (P-Wert < 1 %) zwischen Wildtyp und *cpk21-1* ermittelt werden (Abbildung 3-4, [C]). Die Berechnung mittels Logit-Modell ist im Anhang 6 dargelegt. Bei Expression des *pCPK21::CPK21*-Konstrukts im genomischen *cpk21-1*-Hintergrund konnte der Phänotyp komplementiert werden. Die Komplementationslinie zeigte eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität gegenüber Mannitol (Abbildung 3-4). Daher wird angenommen, dass die erhöhte Toleranz der *cpk21-1* gegenüber hyperosmotischen Bedingungen auf das Fehlen der CPK21 zurückzuführen ist.

Interessanterweise zeigte der Wildtyp unter den unterschiedlichen Anzuchtbedingungen mit vergleichbarem osmotischem Potenzial eine differenzielle Ausprägung von abiotischen Stresssymptomen (Abbildung 3-4, [A]). Das osmotische Potenzial für NaCl oder Mannitol wurde mit der Van-'t-Hoff-Gleichung berechnet und betrug für 100 mM NaCl und 200 mM Mannitol ca. -0,49 MPa sowie für 150 mM NaCl und 300 mM Mannitol ca. -0,75 MPa. Das PEG-abhängige osmotische Potenzial betrug -0,45 MPa bzw. -0,95 MPa (Verslues et al. 2006). Die Angabe des osmotischen Potenzials erfolgt ohne Berücksichtigung des MS-Mediums oder des Zuckers, da deren Konzentration unter allen Bedingungen identisch war. Es muss angenommen werden, dass neben dem Osmotischenpotenzial auch andere Faktoren die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen.

Im Folgenden sollen Unterschiede zwischen dem durch Mannitol, NaCl oder PEG induzierten Stress herausgearbeitet werden, um eine Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen der Pflanzen zu liefern. Osmolyte mit geringem Molekulargewicht, z. B. Mannitol, aber auch NaCl können die Zellwandporen passieren. PEG mit einem Molekulargewicht > 6000 g/Mol kann von Pflanzen nicht aufgenommen werden. Mannitol kann im Gegensatz zu PEG durch Penetration der Zellwand direkt auf den Protoplasten

wirken und dessen Wasserverlust und Volumenreduktion auslösen (Verslues et al. 2006). Des Weiteren konnte ein toxischer Effekt von Mannitol beobachtet werden, der die Ausprägung des Phänotyps der Pflanzen beeinflussen könnte. Salzstress (NaCl) führt neben der Reduktion des osmotischen Potenzials auch zur Destabilisierung des Ionengleichgewichts mit einer toxischen Komponente (Verslues et al. 2006). So kann ein erhöhtes Na^+/K^+ -Verhältnis zur Inhibierung K^+ -abhängiger Enzyme führen.

In dieser Arbeit wurde die Anzahl chlorotischer Pflanzen ermittelt (Abbildung 3-4). Chlorosen treten als Folgen von Chlorophyllmangel auf. Bei Wassermangelstress werden sie durch einen zu geringen Nährstofftransport hervorgerufen.

Die Ausbildung von Chlorosen war bei NaCl-Behandlung schwächer ausgeprägt als bei PEG- oder Mannitol-Behandlung (Abbildung 3-4). Bei einem publizierten Vergleich des Einflusses von NaCl und PEG auf das Keimlingswachstum konnte bei vergleichbarer Wasserpotenzialdifferenz gezeigt werden, dass PEG das Spross-, aber nicht das Wurzelwachstum inhibierte, wohingegen 100 mM NaCl das Wurzelwachstum inhibierten (Verslues et al. 2006). Die Inhibierung des Wurzelwachstums durch NaCl erklärten Verslues et al. durch den auf die Wurzeln wirkenden toxischen Effekt des Na^+ . Für die NaCl-Behandlung zeigte sich eine im Vergleich zum Wurzelwachstum geringere Reduktion des Sprosswachstums; daher wird von einer geringen NaCl-Menge im Spross ausgegangen. Diese postulierte geringe NaCl-Konzentration im Spross könnte durch einen geringen NaCl-Transport, verbunden mit einer geringen Transpiration auf Platten, zustande kommen. Die in den hier durchgeführten Experimenten beobachtete schwächere Ausprägung der Chlorosen bei NaCl im Vergleich zu Mannitol oder PEG könnte auf eine Kombination eines lokal toxischen Effekts auf die Wurzel und eines reduzierten toxischen Effekts auf den Spross zurückzuführen sein. Des Weiteren könnten Anpassungen an den toxischen Effekt durch NaCl den osmotischen Effekt maskieren. Für die *cpk21-1* wurde bei Behandlung mit Mannitol, aber nicht mit NaCl eine erhöhte Toleranz gegenüber der Bildung von Chlorosen beobachtet (Abbildung 3-4), was auf eine Funktion der CPK21 bei osmotischem Stress, aber nicht bei der spezifischen Salzstressantwort hindeutet.

Für die *cpk21-1* könnte bei Mannitol aber nicht bei PEG eine erhöhte Toleranz gegenüber hyperosmotischem Stress beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen PEG und Mannitol könnten auf eine mögliche Funktion der CPK21 bei der Aufnahme oder des Metabolismus von Mannitol hindeuten, was eine Reduktion des toxischen Effekts von Mannitol bewirken würde und ein Erklärungsmodell für die erhöhte Resistenz der *cpk21-1* gegenüber Mannitol darstellt.

Für die *cpk21-1* konnten eine transkriptionelle Hochregulierung von abiotischen Stress-Markergenen ohne abiotische Stressbehandlung (Abschnitt 4.2.3) und die Akkumulation des

Osmolyten Prolins nach Trockenstress gezeigt werden (Franz et al. 2011). Des Weiteren wurde für die CPK21 eine regulatorische Funktion bei der ABA-Antwort nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.4.1). Unter abiotischem Stress, besonders unter Trocken- und Salzstress, akkumulieren Pflanzen große Mengen von ABA, begleitet von wesentlichen Änderungen der Genexpression (Qin et al. 2011). Viele ABA-induzierte Gene haben eine Funktion bei der abiotischen Stressresistenz, z. B. bei der Osmolyt-Biosynthese (Leung und Giraudat 1998; Hasegawa et al. 2000; Nambara et al. 2002; Zhu 2002). Daher könnte die erhöhte osmotische Stresstoleranz eine Folge der CPK21-Funktion bei der ABA- und abiotischen Stress-Signaltransduktion darstellen. Bei der Betrachtung der bereits erwähnten anderen Ergebnisse zur Funktion der CPK21 erscheint dies wahrscheinlicher als eine direkte Funktion bei der Regulierung der Mannitol-Konzentration.

4.2.3 *cpk21-1* und *cpk23-1* zeigen eine erhöhte Expression ABA- und abiotischer Stress-abhängiger Markergene

In den Linien *cpk21-1* und *cpk23-1* konnte unter Kontrollbedingungen (1 MS mit 3 % Saccharose) eine Hochregulierung der abiotischen Stress-Markergene *RD29A*, *RD29B*, *COR15A* und *DREB1A* gezeigt werden (Abbildungen 3-5, 3-6 und 3-7), was auf eine Funktion der CPK21 und CPK23 als negativen Regulatoren der abiotischen Stressantwort hindeutet. Für die *CPK21*-Komplementationslinie konnte eine partielle Komplementation beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Komplementationslinie in der phänotypischen Analyse eine mit dem Wildtyp vergleichbare osmotische Stresssensitivität. Auch wenn es wahrscheinlich ist, dass das Fehlen der CPK21 zur Deregulierung der Markergene führt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren beteiligt sind. Bei der Betrachtung der Expression der *CPK21* in der Komplementationslinie und im Wildtyp konnte eine erhöhte *CPK21*-Expression in der Komplementationslinie beobachtet werden. Der verwendete *CPK21*-Promoterbereich umfasst 800 bp vor dem Transkriptionsbeginn. Fehlende regulatorische Elemente im Promoterbereich könnten zu der unterschiedlich starken Expression führen. Ob diese Transkriptmengenunahme zu einer vergleichbaren Proteinmengenunahme führt, konnte nicht untersucht werden. Eine solche Untersuchung könnte nur mit einem Antikörper gegen das native CPK21-Protein erfolgen, der nicht vorhanden war. Auffällig war auch die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte *CPK23*-Expression in der Komplementationslinie, die auch einen Einfluss auf die CPK21-Funktionalität haben könnte.

RD29B wurde in der ABA-abhängigen *COR15A*, *DREB1A* in der ABA-unabhängigen abiotischen Stressantwort-abhängigen Genregulation beschrieben (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006).

So enthält das ABA-abhängige Gen *RD29B* im Promoter zwei AREB-cis-Elemente (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Die AREB/ABF-Transkriptionsfaktorfamilie, zu der AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF1 und ABF3 gehören binden an AREB-cis-Elemente (Choi et al. 2000; Uno et al. 2000; Kang et al. 2002; Fujita et al. 2005). Die Aktivierung des AREB/ABF-Transkriptionsfaktors erfolgt durch eine ABA-abhängige Phosphorylierung einer konservierten Region, z. B. durch die SnRK2-Protein-Kinasen siehe auch Abschnitt 1.4.2 (Furihata et al. 2006; Fujii et al. 2009). Zusammengefasst wird die *RD29B*-Transkription durch ABA und das Grundgerüst der ABA-Signaltransduktion (Einleitung, Abschnitt 1.4.2) reguliert. Der ABF4-Transkriptionsfaktor wurde als *in vivo* Substrat von den CDPKs CPK4, CPK11, CPK12 und CPK32 diskutiert (Choi et al. 2000; Zhu et al. 2007; Zhao et al. 2011b), was eine Verbindung zwischen dem Grundgerüst der ABA-Signaltransduktion und der Ca²⁺-abhängigen Antwort aufzeigen würde.

Das DRE-Binding-Protein 1A (*DREB1A*) gehört zu einer Familie der DREB1-Transkriptionsfaktoren, die an DRE-cis-Elemente binden und wichtige Regulatoren der ABA-unabhängigen abiotischen Stress-Signaltransduktion sind (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). DREB1-Transkriptionsfaktoren sind als Hauptregulatoren der kälteabhängigen Genregulation beschrieben, wohingegen die verwandten Transkriptionsfaktoren DREB2 in der Salz- und Trocken-Stressantwort beschrieben sind. Für *DREB1A*-Überexpressionslinien konnten eine erhöhte Frost-, aber auch eine erhöhte Trocken- und Salztoleranz beobachtet werden (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006), was neben der Funktion bei Kältestress auf eine mögliche Rolle bei anderen abiotischen Stressantworten hinweisen könnte. Des Weiteren konnte für einige DREB1-Transkriptionsfaktoren einschließlich *DREB1A* eine transkriptionelle Induktion nach exogener ABA-Zugabe beobachtet werden (Fujita et al. 2011). Der „Inducer of CBF Expression 1“ (*ICE1*) konnte für *DREB1A* als regulatorischer Transkriptionsfaktor bei Kältestress identifiziert werden (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Zu den durch *DREB1A* regulierten Genen gehören auch *COR15A* und *RD29A* (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Transkription von *COR15A* und *RD29A* könnte unter anderem durch die erhöhte Transkription von *DREB1A* bedingt sein. Für *COR15A* wurden neben einer kälteabhängigen Induktion der Transkription auch Trockenstress- und ABA-abhängige cis-regulatorische Elemente im Promoterbereich beschrieben (Baker et al. 1994). Auch die *RD29A*-Transkription wird abiotischen Stress-abhängig, aber ABA-unabhängig und ABA-abhängig hochreguliert (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Der *RD29A*-Promoter enthält das ABA-unabhängige cis-Element DRE und ein ABRE-Element. So enthält der *RD29A*-Promoter Bindestellen für DREB1 und DREB2 sowie ABRE-Transkriptionsfaktoren (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006). Die

Regulierung der untersuchten abiotischen Stress-Markergene ist in Abbildung 4-1 vereinfacht dargestellt.

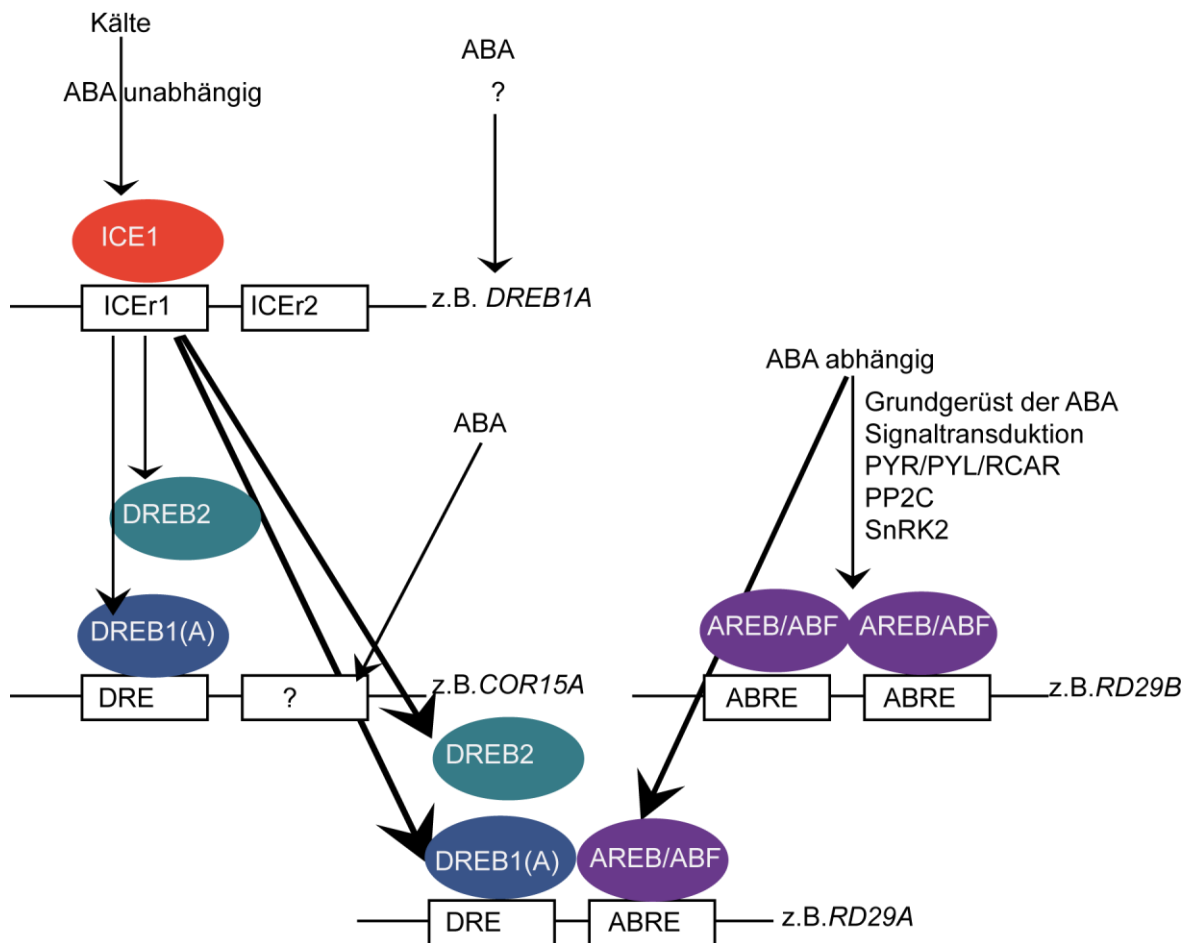


Abbildung 4–1: Regulierung der untersuchten abiotischen Stress-Markergene. Promoter-cis-Elemente sind als weiße Rechtecke mit Benennung dargestellt. Transkriptionsfaktoren sind oval dargestellt. Die Darstellung umfasst nur einen Ausschnitt der regulatorischen Zusammenhänge und stellt ein stark vereinfachtes Modell dar.

Zusammengefasst fällt auf, dass die untersuchten Markergene Gene umfassen, die sowohl in der ABA-abhängigen Genregulation als auch in der ABA-unabhängigen Stressantwort-abhängigen Genregulation beschrieben wurden. Diese Gene stellen nur einen kleinen Teil der differenziell in der abiotischen Stressantwort regulierten Gene dar und wurden aufgrund von Vordaten ausgewählt (Dissertation Sandra Franz 2008). Die Daten ermöglichen nicht, eine relevante Aussage zu in der *cpk21-1* und *cpk23-1* differenziell regulierten Transkriptionsfaktoren abhängiger Gengruppen zu treffen. Der lange Wachstumszeitraum ermöglicht eine Vielfalt regulatorischer Mechanismen, die direkt oder indirekt zu einer Deregulierung einiger abiotischen Stress-Markergene führen könnten.

Trotz der gut untersuchten transkriptionellen Regulierung von RD29A und RD29B ist nichts über deren Funktion in der abiotischen Stressantwort bekannt. Für COR15A, einem LEA-Proteinen, konnte unter verschiedenen Bedingungen abiotischen Stresses eine

Funktion beim Aggregationsschutz von Proteinen beobachtet werden (Nakayama et al. 2008).

Die weitere, genauere Analyse der Funktion der CPK21 und CPK23 in der ABA-Antwort erfolgte mithilfe eines transienten Systems unter Verwendung des *RD29B*-Promoters.

4.2.4 CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion

4.2.4.1 CPK21 und CPK23 als negative Regulatoren in der ABA- und RCAR1-abhängigen *RD29B*-Expression

Die Untersuchung der CPK21- und CPK23-Funktion bei der ABA-Signaltransduktion erfolgte transient in *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten unter Verwendung von Luciferase als molekularem „read out“ unter transkriptioneller Kontrolle des *RD29B*-Promoters. *RD29B* konnte in den *cpk21-1* und *cpk23-1*-T-DNA-Insertionslinien als ein unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu Col-0 hochreguliertes Markergen beschrieben werden (Abschnitt 4.2.3). Interessanterweise konnte im Vergleich zum Wildtyp eine RCAR1-abhängige Induktion der Transkription von *pRD29B::LUC* in *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten der *cpk21-1* und *cpk23-1* beobachtet werden (Abbildung 3-8). Die in beiden Versuchen gezeigte Induktion der *RD29B*-Transkription deutet auf eine Funktion der CPK23 und CPK21 als negativen Regulatoren in der ABA-Signaltransduktion hin. Die in Abbildung 3-8 untersuchte Induktion der *pRD29B::LUC*-Transkription erfolgte durch Koexpression des ABA-Rezeptors RCAR1. Dieser RCAR1-abhängige Anstieg ohne exogene ABA-Zugabe der Luciferaseaktivität bei Verwendung von *pRD29B::LUC* wurde bereits von Ma et al. (2009) beschrieben, die eine Induktion der ABA-Signaltranskription durch Bindung endogener ABA an den überexprimierten Rezeptor postulierten. Unterstützt wurde ihre Annahme durch das Fehlen dieses RCAR1-Überexpressions-Effekts in ABA-defizienten Mutanten (Ma et al. 2009).

Zur weiteren Analyse der Rolle der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion wurde ein „Funktionssteigerungs“-Ansatz, durch Überexpression der CPK21 und CPK23, verwendet. Für die CPK23 konnte dabei eine Reduktion der RCAR1-abhängigen Zunahme der Luciferaseaktivität beobachtet werden, was sowohl ohne als auch mit exogener ABA-Zugabe gezeigt werden konnte (Abbildungen 3-9 und 3-10). Für die CPK21 konnte kein Effekt auf die RCAR1-abhängige *RD29B*-Expression beobachtet werden (Abbildung 3-11). Die in Abschnitt 4.1 dargelegten Überlegungen zur CPK23- und CPK21-Ca²⁺-Abhängigkeit zeigen für die CPK21 eine strikte Ca²⁺-abhängige Regulierung der Kinaseaktivität und für die CPK23 einen Ca²⁺-unabhängigen Aktivierungsmechanismus. Daher wurde die CPK21-Funktion mit einer konstitutiv aktiven Ca²⁺-unabhängigen CPK21-Variante weitergehend untersucht. Diese Variante enthält nur die N-terminale variable Domäne und die Kinasedomäne. Wegen des Fehlens des Pseudosubstratsegments kann keine Inhibition der

Kinasedomäne erfolgen, und daher ist diese Variante konstitutiv aktiv. Für diese konstitutiv aktive CPK21-Variante konnte eine Reduktion der RCAR1-abhängigen, ABA-abhängigen RD29B-Transkription beobachtet werden (Abbildung 3-12). Diese Ergebnisse deuten auf einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus der CPK21 und CPK23 *in vivo* hin.

Es konnte gezeigt werden, dass pharmakologisch wirksame Ca^{2+} -Ionophore im Protoplasteninkubationsmedium zu einer Induktion der Transkription eines abiotischen Stress-abhängigen Gens in der Abwesenheit von zusätzlichen Stressstimulie führen kann (Sheen 1996). Dies deutet auf eine wichtige Funktion von Ca^{2+} in der Stress-Signaltransduktion in Protoplasten hin. Durch die Verwendung einer konstitutiv aktiven Variante können Effekte, die wegen des Fehlens des für die Ca^{2+} -Oszillation wichtigen Extrazellulärraums auftreten, umgangen werden. Eine in diesem Zusammenhang interessante Frage ist, ob in Protoplasten eine *in planta* vergleichbare ABA-abhängige Ca^{2+} -Oszillation auftritt. Die Messungen von Ca^{2+} -Signalen in Spaltöffnungen zeigten eine Abhängigkeit des Ca^{2+} -Konzentrations-Anstiegs vom extrazellulären Medium. So konnte gezeigt werden, dass

- eine geringe Ca^{2+} -Konzentration ($< 200 \text{ nM}$) im extrazellulären Medium zytosolische Ca^{2+} -Konzentrations-Anstiege stört (Hubbard et al. 2012) und
- hohe K^+ -Konzentrationen (100 mM) im extrazellulären Medium zu einem positiven (depolarisierten) Membranpotenzial führt, was die zytosolische Ca^{2+} -Zunahme stört (Hubbard et al. 2012).

Das in den Experimenten verwendete leicht modifizierte *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten-System wurde für transiente Genexpressionsanalysen entwickelt (Yoo et al. 2007), und damit konnte die ABA-abhängige Regulierung des Reporterkonstrukts *RD29A::LUC* erfolgreich untersucht werden (Hwang und Sheen 2001). Die stressabhängige Regulierung erfolgte aber in einem Protoplastenmedium ohne externe Ca^{2+} -Zugabe und mit hohen K^+ -Konzentrationen (100 mM). Auch wenn sich Mesophyllzellen und Spaltöffnungen in ihrer Zusammensetzung von Membrankanälen unterscheiden, erscheint ein ähnlicher Einfluss des extrazellulären Mediums auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration doch wahrscheinlich. Daher stellt sich die Frage, inwieweit in dem verwendeten Protoplastensystem ein natives ABA-abhängiges Ca^{2+} -Signal auftritt. Diese Frage ist in der Literatur noch nicht untersucht worden. Beim Fehlen des in Pflanzen auftretenden ABA-abhängigen Ca^{2+} -Signals könnte die CPK21 nicht Ca^{2+} -abhängig aktiviert werden. Damit könnte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen eine Regulierung durch die CPK21 nicht stattfinden. Im Gegensatz dazu könnte die hohe Ca^{2+} -unabhängige Aktivität der CPK23 auch ohne natives Ca^{2+} -Signal zur beobachteten *in vivo* Funktion führen. Eine spannende Frage, die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht analysiert werden konnte, wäre

die nach dem Effekt eines anderen Protoplastenmediums auf die Funktion der CPK21 in der ABA-abhängigen *pRD29B::LUC*-Expression.

In einem anderen experimentellen System der Aktivierung der Anionenkanäle in *Xenopus*-Oozyten konnte ein ähnlicher Unterschied zwischen der konstitutiv aktiven CPK21 und der CPK21 (Gesamtzym) sowie der CPK23 (Gesamtzym) beobachtet werden (Geiger et al. 2010). So zeigte eine konstitutiv aktive Variante der CPK21 und der CPK23 eine vergleichbare Aktivierung von SLAC1. Die CPK21 (Gesamtzym) führte zu einer drastisch reduzierten Aktivierung von SLAC1, wohingegen die CPK23- (Gesamtzym-) abhängige SLAC1-Aktivität ca. 80 % der vorherigen Aktivität betrug. Die Verfasser vermuteten, dass die Ca^{2+} -Konzentration in Oozyten für die Aktivierung der CPK23, aber nicht für die der CPK21 ausreiche (Geiger et al. 2010).

Zusammengefasst kann in einem Überexpressionsansatz für beide Kinasen eine Funktion als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion gezeigt werden, was mit dem konträren Phänotyp im Funktionsverlustansatz korreliert, und die Ergebnisse deuten auf einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus der CPK21 und CPK23 *in vivo* hin.

4.2.5 Teilweise überschneidende Funktionen der CPK21 und CPK23

Für die in dieser Arbeit verwendete Linie *cpk23-1* beschrieben Ma und Wu (2007) eine erhöhte Trockenstressresistenz, eine osmotische Stressresistenz sowie eine reduzierte Stomataöffnung. Ein *CPK23*-Überexpressor zeigte den entgegengesetzten Phänotyp mit einer erhöhten Sensibilität gegenüber Trockenstress und eine vergrößerte Stomataöffnung (Ma und Wu 2007). Der *cpk23-1*-Phänotyp war stärker und trat unter mehr abiotischen Stressbedingungen auf als der für die *cpk21-1* beobachtete (Abschnitt 4.2.2) (Franz et al. 2011). Bei der molekularbiologischen Analyse der Expression abiotischer Stress-Markergene (Abschnitt 4.2.3) konnte eine Deregulierung sowohl in der *cpk21-1* als auch in der *cpk23-1* beobachtet werden. Die Hochregulierung der *CPK23*-Transkription in der *cpk21-1* (Abbildungen 3-5 und 3-6) und *vice versa* (Geiger et al. 2010) deuten auf eine partielle funktionelle Komplementation der *CPK23* in der *cpk21-1* und entsprechend auf eine der *CPK21* in der *cpk23-1* hin. Solche teilweise überschneidenden Funktionen wurden bereits für homologe CDPKs beschrieben. So zeigte die *cpk4cpk11* Doppelmutante einen deutlich stärkeren ABA-abhängigen Phänotyp als die entsprechenden Einzelmutanten (Zhu et al. 2007), und auch die *cpk3cpk6* Doppelmutante zeigte eine im Vergleich zu den Einzelmutanten verstärkte Reduktion des Anionstroms (Mori et al. 2006). Die Herstellung einer *cpk21cpk23* Doppelmutante wäre deswegen von großem Interesse. Die beiden Gene liegen im Genom direkt benachbart (Abbildung 1-4), was die Herstellung einer Doppelmutante durch Kreuzung behindert. Auch durch RNAi war die Herstellung einer *cpk21cpk23* Doppelmutante bisher nicht gelungen.

Die Analysen der Funktion der CPK21 und CPK23 bei der ABA-Signaltransduktion unter Verwendung von *pRD29B::LUC* als Marker zeigen eine ähnliche Funktion der beiden CDPKs als negativen Regulatoren der ABA-Signaltransduktion (Abschnitt 4.2.4.1). Interessanterweise zeigt der in Abschnitt 4.2.4.1 diskutierte unterschiedliche Aktivierungsmechanismus *in vivo* für die CPK21 und CPK23 aber einen möglicherweise entscheidenden funktionellen Unterschied auf.

4.2.6 Interaktions- und regulatorische Analyse mit anderen Komponenten der ABA-Signaltransduktion

Auch wenn eine regulatorische Funktion der CPK21 und CPK23 bei der ABA-Signaltransduktion gezeigt werden konnte, bleibt der genaue Mechanismus unklar. So stellt sich die Frage nach möglichen regulatorischen Zusammenhängen der CPK21 und CPK23 mit bekannten Komponenten der ABA-Signaltransduktion. 2009 konnte eine Gruppe von Komponenten identifiziert werden, die für die ABA-Signaltransduktion von der ABA-Rezeptor-Bindung bis zur transkriptionellen Regulierung der ABA-abhängigen Gene hinreichend zu sein scheinen (Fujii et al. 2009). Diese Komponenten sind

- die ABA-Rezeptoren PYR/PYL-RCAR,
- PP2C-Phosphatasen, die mit den ABA-gebundenen Rezeptoren interagieren,
- PP2C-regulierte Kinasen SnRK2s und
- die SnRK2-Substrate der ABF-Transkriptionsfaktoren (Abschnitt 1.4.2).

Diese Komponenten stellen das „Grundgerüst“ der ABA-Signaltransduktion dar. Obwohl Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff eine wichtige Funktion bei der ABA-Signaltransduktion hat (Alistair 2001; Schroeder et al. 2001b; Hirayama und Shinozaki 2007; Siegel et al. 2009), wird eine direkte Ca^{2+} -Bindung für keine Komponente des Grundgerüsts der ABA-Signaltransduktion angenommen (Hubbard et al. 2010). Die mögliche Vernetzung der Komponenten der ABA-Signaltransduktion mit Ca^{2+} -abhängigen Proteinen, wie z. B. CDPKs, ist somit von generellem Interesse für das Verständnis der ABA-Signaltransduktion.

4.2.6.1 PP2Cs als Interaktoren der CPK21 und CPK23

In diesem Zusammenhang ist sehr interessant, dass in Hefe-Zweihybrid-Interaktionsanalysen die PP2C-**ABA-Insensitive-2** (ABI2) als Interaktionspartner einer zur CPK23 Homologen CDPK aus *Landsberg erecta* (LerCDPK) identifiziert worden ist (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Erwin Grill). Diese Interaktion wurde von der Verfasserin *in vivo* bestätigt. Die Untersuchung der *in vivo* Interaktion erfolgte durch Co-IP in *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten (Abbildung 3-13). Beim Vergleich der ABI2-Interaktion für die CPK23 homologe LerCDPK und die nah verwandten ColCPK21 zeigte die LerCDPK eine

stärkere Interaktion. Auch die zur weiteren Kontrolle verwendeten CDPKs ColCPK5 und ColCPK31 ergaben eine im Vergleich zu LerCDPK deutlich schwächere Interaktion mit ABI2 (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der großen Homologie zwischen den verschiedenen CDPK-Isoformen erscheint es nicht überraschend, dass andere CDPK-Isoformen ebenfalls ein Interaktionssignal zeigten. Auch die Tatsache, dass bereits eine andere CDPK, die CPK12, in Hefe-Zweihibrid-Interaktionsanalysen als Interaktor von ABI2 identifiziert worden ist, deutet auf die Beteiligung homologer CDPK-Bereiche an der Interaktion hin (Zhao et al. 2011a). Dass die zur CPK23 homologe LerCDPK das stärkste Interaktionssignal aller untersuchten CDPK-Isoformen aufweist, könnte auf eine mögliche *in vivo* Relevanz der Interaktion hindeuten. Funktionelle Analysen zur Beurteilung der *in vivo* Relevanz der postulierten Interaktion, z. B. durch Untersuchung des Einflusses von ABI2 auf die CPK23-abhängige *pRD29B:LUC*-Expression, stehen aus. Dennoch erscheint dieses Ergebnis bemerkenswert; zeigt es doch eine mögliche Verbindung zwischen den untersuchten CDPKs und einer Komponente des Grundgerüsts der ABA-Signaltransduktion auf. Im Rahmen der Identifizierung der *in vivo* Substrate der ColCPK21 und ColCPK23, SLAC1 und SLAH3, (Abschnitt 4.2.6.2) wurde auch die ABA-abhängige Regulierung der ColCPK21 und ColCPK23 untersucht (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). In diesem Zusammenhang konnte mithilfe von BiFC-Interaktionsstudien eine Interaktion zwischen ColCPK23 und ABI1 sowie von ColCPK21 mit ABI1 und ABI2 nachgewiesen werden (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). Auch konnten in *Xenopus*-Oozyten ABI1 und ABI2 als negative Regulatoren der CDPK-abhängigen Anionenkanalaktivität identifiziert werden (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). Auch wenn die von Geiger et al. (2010 und 2011) vorgeschlagene regulatorische Funktion der PP2Cs ABI1 und ABI2 für die CPK21- und CPK23-Kinaseaktivität im Zusammenhang mit der Stomataregulierung untersucht wurde, erscheint aufgrund der Homologie des Systems in Mesophyllzellen ein ähnlicher regulatorischer Zusammenhang wahrscheinlich.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPK23 (Abschnitt 4.1.1) erscheint es aber unwahrscheinlich, dass die CPK23 in der ABA-Signaltransduktion die Funktion einer Ca^{2+} -regulatorischen Komponente einnimmt.

4.2.6.2 Anionenkanäle als *in vivo* Substrate der CPK21 und CPK23

Ein zentraler Schritt beim Schließen der Stomata ist die Aktivierung von Anionenkanälen. 2010 konnte der Anionenkanal SLAC1 als *in vivo* Substrat der CPK23 und CPK21 identifiziert werden (Geiger et al. 2010). Der homologe Anionenkanal SLAH3 konnte als CPK21-Substrat ermittelt werden (Geiger et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vivo* Interaktion mithilfe von Co-IP für SLAC1 und CPK23 gezeigt (Abbildung 3-14). Unterstützt wird die Annahme einer CPK23- und CPK21-abhängigen SLAC1-Regulierung durch BiFC-Interaktionsstudien, Anionenstrommessungen nach Koexpression der CDPK mit

SLAC1 in *Xenopus*-Oozyten und Anionenstrommessungen in Stomataprotoplasten der *cpk23-1* (Geiger et al. 2010). Auch konnte die *in vitro* Phosphorylierung des zytosolischen N-Terminus von SLAC1 durch die CPK23 und CPK21 gezeigt werden (Abbildung 3-16 und 3-20; Geiger et al. 2010).

In den Analysen von SLAH3 konnte die ABA-abhängige, CPK21-abhängige *in vivo* Phosphorylierung der zytosolischen N-terminalen Domäne von SLAH3 in Experimenten nachgewiesen werden (Abbildung 3-15). Die weitere Untersuchung von SLAH3 als Substrat der CPK21 erfolgte durch BiFC-Interaktionsstudien, Anionenstrommessungen nach Koexpression der CPK21 mit SLAH3 in *Xenopus*-Oozyten und CPK21 *in vitro* Kinaseaktivitätsmessungen mit dem SLAH3-N-Terminus als Substrat (Geiger et al. 2011). Interessanterweise bringen beide Veröffentlichungen die CPK23 und CPK21 mit anderen Komponenten des Grundgerüsts der ABA-Signaltransduktion in Verbindung. So konnte gezeigt werden, dass die CPK21- und CPK23-abhängige Aktivierung der Anionenkanäle durch PP2Cs reguliert wird und der Anionenkanal SLAC1 auch durch OST1 aktiviert werden kann.

Des Weiteren konnte *in vitro* der ABA-Signaltransduktionsweg von der ABA-Bindung bis zur CDPK-abhängigen Phosphorylierung der N-terminalen Domäne des Anionenkanals gezeigt werden. Die mit diesen Daten postulierten regulatorischen Zusammenhänge sind in Abbildung 4-2 schematisch dargestellt.

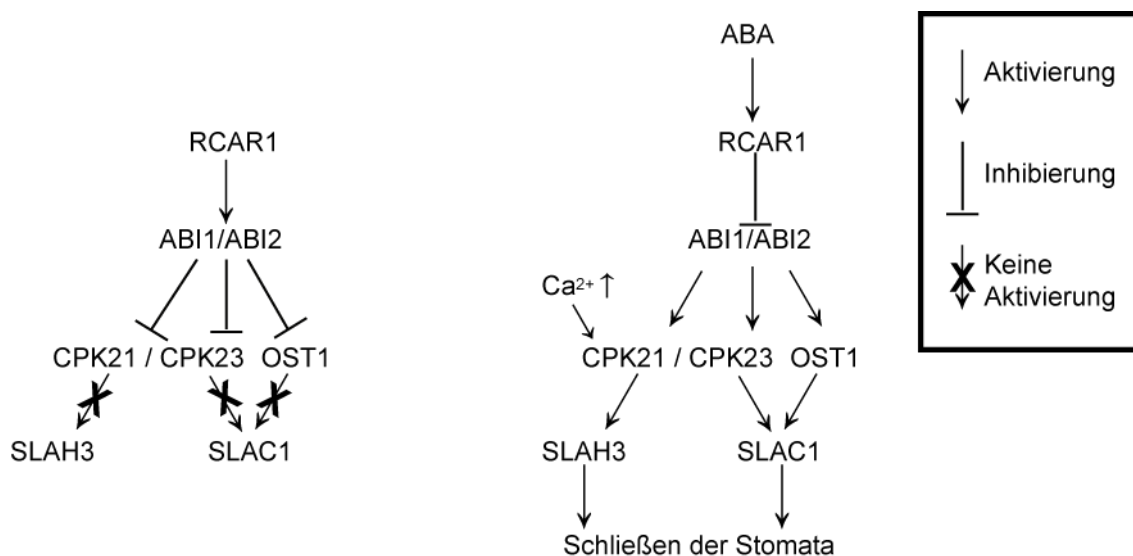


Abbildung 4–2: Schematische Darstellung der zur SLAH3- und SLAC1-Aktivierung führenden ABA-Signaltransduktionswege in den Stomata.

Abbildung nach Geiger et al. (2011). In Abwesenheit von ABA (links) blockieren die Phosphatasen ABI1 und ABI2 die Kinasen CPK21, CPK23 und OST1. Nach ABA-Bindung an den Rezeptor (rechts) interagiert dieser mit ABI1 und ABI2 und inhibiert deren Phosphataseaktivität. Dies ermöglicht eine Autophosphorylierung der Kinase, was zu deren Aktivierung führt. Die CPK21-Aktivität benötigt einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. SLAH3 wird durch die Ca^{2+} -abhängige CPK21, SLAC1 durch die CPK21, CPK23 und OST1 aktiviert.

Interessanterweise wurde in einer aktuellen Arbeit SLAC1 auch als *in vivo* Substrat der CPK6 identifiziert (Brandt et al. 2012). In dieser Publikation wird aufgrund der Daten ein Modell entwickelt, in dem die CPK6-Aktivität unabhängig von ABI1 oder OST1 ist. Diese Publikation zeigt eine direkte Dephosphorylierung von SLAC1 durch ABI1. Dies könnte das Modell insofern erweitern, als neben einer Regulierung der Kinaseaktivität der CPK21 und CPK23 durch RCAR1/ABI1 dann auch eine direkte Regulierung von SLAC1 durch RCAR1/ABI1 bei der SLAC1-Regulierung von Bedeutung wäre.

4.2.6.3 Unterschiedliche Funktionen der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion in unterschiedlichen Zelltypen

Die CPK21 und CPK23 konnten als positive Regulatoren beim ABA-abhängigen Schließen der Stomata identifiziert werden. Die *in vivo* Daten unter Verwendung der *cpk21-1* und *cpk23-1* zeigen aber deren Funktion als negative Regulatoren der ABA- und abiotischen Stress-Signaltransduktion auf. Auch bei transienten Analysen in *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten unter Verwendung von *pRD29B::LUC* als Reporter konnte eine Funktion von CPK21 und CPK23 als negativen Regulatoren in der ABA-Signaltransduktion gezeigt werden, was auf zwei unterschiedliche Funktionen der CDPKs in unterschiedlichen Zelltypen hindeutet. Interessant erscheint dies, da in beiden Zelltypen ein ähnlicher ABA-regulatorischer Komplex aus ABA-Rezeptor, PP2C und SnRK2 beschrieben werden konnte. Daher könnten in beiden Zelltypen auch ähnliche funktionelle Zusammenhänge zwischen den CDPKs und den Komponenten der ABA-Signaltransduktion bestehen. Alle Untersuchungen zu CPK21 oder CPK23 enthaltende regulatorische Komplexe erfolgte *in vitro* oder durch ektopische Expression in Modellsystemen wie *Xenopus*-Oozyten (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). In dieser Dissertation erfolgten die Interaktions- und regulatorischen Analysen mit anderen Komponenten der ABA-Signaltransduktion sowie die Analysen zur Funktion der CPK21 und CPK23 in der ABA-Signaltransduktion transient in Protoplasten. Interessant wäre ob sich in unterschiedlichen Zelltypen oder Geweben unterschiedliche Komplexe der Komponenten der ABA-Signaltransduktion ausbilden. So konnte bei Interaktionsanalysen in *in vitro* Untersuchungen oder in transienter Analysen in Tabak mehrere mögliche Kombinationen an ABA-Rezeptor und PP2Cs identifiziert werden (Hubbard et al. 2010). Welche dieser Kombination in welchen Zelltyp *in vivo* auftreten wurde noch nicht untersucht. Auch über die gewebsspezifische Expression der 14 Mitglieder der PYR/PYL-RCAR-Proteinfamilie ist nichts bekannt. Unterschiedliche ABA-Rezeptorkomplexe könnten unterschiedlich die CDPK-Funktion regulieren. Ein ergänzender und alternativer Erklärungsansatz wäre eine unterschiedliche CDPK-Funktion durch unterschiedliche Substrate; des Weiteren könnten auch unterschiedliche regulatorische Zusammenhänge mit anderen Komponenten bestehen. So könnte die CDPK-Funktion in den Stomata und Mesophyllzellen durch differenzielle Phosphorylierung und Dephosphorylierung

unterschiedlich ABA-abhängig reguliert sein. Die genaueren Zusammenhänge der Funktion der CPK21 und CPK23 in den verschiedenen Zelltypen muss noch untersucht werden.

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) dekodieren entwicklungs- und umweltbedingte Ca²⁺-Signale, übersetzen sie in Phosphorylierungsereignisse und aktivieren dadurch Signalkaskaden. In dieser Dissertation wird die Funktion der homologen *Arabidopsis thaliana* CDPKs CPK21 und CPK23 in der abiotischen Stress- und Abscisinsäure- (ABA-) Signaltransduktion untersucht. Hierbei wird erstmals für dieselben CDPKs sowohl die schnelle ABA-Signaltransduktion in Protoplasten als auch die Langzeitadaption an abiotischem Stress unter Verwendung stabiler transgener Linien untersucht.

In phänotypischen Wachstumsversuchen der T-DNA-Insertionslinie *cpk21-1* (SALK_029412) konnte eine erhöhte osmotische Stressresistenz beobachtet werden. Diese Versuche zeigten den Einfluss des Fehlens einer funktionellen CPK21 auf die Langzeitadaption der Pflanzenentwicklung an osmotische Stressbedingungen. Desweiteren konnte selbst unter Kontrollbedingungen eine erhöhte Expression einiger abiotischer Stress- und ABA-abhängiger Markergene in den T-DNA-Insertionslinien *cpk21-1* und *cpk23-1* (SALK_007958) beobachtet werden. Die Analyse der *in vivo* Funktion der CPK23 und CPK21 in der schnellen ABA-abhängige Signaltransduktion erfolgte transient in *A. thaliana*-Blatt-Mesophyll-Protoplasten unter Verwendung eines *pRD29B::LUC*- (Luciferase-) Konstrukts als molekularbiologischen Marker. Die CPK21 und CPK23 konnten als negative Regulatoren der schnellen abiotischen Stress- und ABA-Signaltransduktion identifiziert werden.

Desweiteren konnten in *in vivo* Interaktionsstudien und regulatorische Analysen zusätzliche Komponenten der ABA-Signaltransduktion wie z.B. Anionenkanäle als *in vivo* Substrate oder Interaktoren identifiziert werden.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Ca²⁺-Abhängigkeit der CPK21- und CPK23-Kinaseaktivität dar. Die CPK23 zeigte im Gegensatz zur CPK21 eine Ca²⁺-unabhängige Aktivität. Damit scheint die CPK23 die erste beschriebene Ca²⁺-unabhängige CDPK, darzustellen. Der Vergleich zweier so homologer Kinasen ermöglicht es, Unterschiede in der biochemischen Aktivität mit Aminosäure-Sequenzunterschieden zu korrelieren. Zwei wichtige Aminosäurevariationen konnten identifiziert werden:

- I. Die Ca²⁺-Bindeschleife der CPK23-EF-Hand 1 entspricht nicht dem EF-Hand-Konsensusmotiv; daher wurde die Ca²⁺-spezifische Bindestelle durch Punktmutation der EF-Hand (Q393E) restauriert.
- II. Im Pseudosubstratsegment der CPK23 befindet sich an der entsprechenden Position eines in Pflanzen hochkonservierten Isoleuzins ein Serin (S362).

Für die beiden Mutanten CPK23Q393E und CPK23S362I zeigte sich eine im Vergleich zum nativen Protein erhöhte Ca^{2+} -Abhängigkeit. Die beiden Aminosäuren konnten als für die Ca^{2+} -Regulation der Kinaseaktivität essenziell identifiziert werden.

Damit gelang es erstmals, die Funktion von CDPKs vom molekularen Mechanismus, ausgehend, durch die Charakterisierung einzelner wichtiger Aminosäuren, bis hin zur *in vivo* Regulation der schnellen und adaptiven Stressantwort zu beschreiben.

5.2 Summary

Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) are implicated in the perception of stress- and developmental stimuli-induced changes in Ca^{2+} concentrations and their respective translation into specific phosphorylation patterns for signal transduction.

This PhD thesis investigates the role of the homologous *Arabidopsis thaliana* CDPKs CPK21 and CPK23 in abiotic stress and abscisic acid (ABA) signal transduction. For the first time CDPKs were analysed in parallel for rapid ABA signal transduction using transient expression in protoplasts and for long term adaption to abiotic stress using stable transgenic lines.

Seedlings of the T-DNA insertion line *cpk21-1* (SALK_029412) were shown to be more tolerant to growth under hyper-osmotic conditions. This indicates the influence of CPK21 on the regulation of long term adaption to osmotic stress. Even in the absence of any exposure to stress, an increased abiotic stress response with respect to abiotic stress and also ABA-induced marker gene expression was demonstrated for both T-DNA insertion lines *cpk21-1* and *cpk23-1* (SALK_007958). The role of the *in vivo* function of CPK21 and CPK23 in rapid ABA signal transduction was addressed in *A. thaliana* leaf mesophyll protoplasts using *pRD29B::LUC* as molecular read-out. These assays allowed the identification of CPK21 and CPK23 as negative regulators of the rapid abiotic stress and ABA signal transduction.

In *in vivo* interaction and phosphorylation studies with components of the ABA signal transduction pathways for e.g. anion channels, *in vivo* targets and interactors could be identified.

A second key aspect is the Ca^{2+} -dependent regulation of CPK21 and CPK23 protein kinase activity. No Ca^{2+} -dependency of CPK23 kinase activity could be observed in contrast to a high Ca^{2+} -dependency for CPK21 kinase activity. Thus CPK23 could be identified as the first Ca^{2+} independent CDPK, leading to the question of amino acid variations in highly homologous proteins. Two crucial amino acids could be identified in CPK23:

- I. -Q393- The Ca^{2+} -binding loop of the EF-hand1 of CPK23 did not match the Ca^{2+} -binding consensus motif. Therefore a more specific Ca^{2+} -binding site *via* reversion of Q393 to E was generated.
- II. -S362- *Via* comparison of the pseudosubstrate segment of CPKs serine (S362) in CPK23 could be identified in place of the CPK consensus isoleucine.

Mutation of this serine to isoleucine and the amino acid exchange in EF-hand 1 from Q393 to E resulted to a regain of Ca^{2+} -dependency of kinase activity.

For the first time CDPKs could be characterised starting from enzyme activity, based on single crucial amino acids, leading to their function in the rapid ABA signal transduction and in the long term adaption to abiotic stress.

6 Quellen

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen HC, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Baker SS, K.S. W, Thomashow MF (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* COR15A has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol* 24: 701-713
- Batistic O, Kudla J (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* 219: 915-924
- Belin C, de Franco P-O, Bourbousse C, Chaignepain S, Schmitter J-M, Vavasseur A, Giraudat J, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2006) Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol* 141: 1316-1327
- Bertani G (1951) The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300
- Bögre L, Oláh Z, Dudits D (1988) Ca²⁺-dependent protein kinase from alfalfa (*Medicago varia*): Partial purification and autophosphorylation. *Plant Sci* 58: 135-144
- Boudsocq M, Droillard MJ, Barbier-Brygoo H, Laurière C (2007) Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 63: 491-503
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464:418-22
- Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjärvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10593-10598
- Chandran V, Stollar EJ, Lindorff-Larsen K, Harper JF, Chazin WJ, Dobson CM, Luisi BF, Christodoulou J (2006) Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): A novel mode of calmodulin-target recognition. *J Mol Biol* 357: 400-410
- Chaudhuri S, Seal A, DasGupta M (1999) Autophosphorylation-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase from groundnut. *Plant Physiol* 120: 859-866
- Cheng S-H, Willmann MR, Chen H-C, Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 129: 469-485
- Choi H-I, Hong J-H, Ha J-O, Kang J-Y, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723-1730
- Choi H-I, Park H-J, Park JH, Kim S, Im M-Y, Seo H-H, Kim Y-W, Hwang I, Kim SY (2005) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a

- transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* 139: 1750-1761
- Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat Protoc* 1: 581-585
- Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* 5: 213-218
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 209-219
- Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF, Chazin WJ (2004) Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279: 29092-29100
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188-1190
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 61: 651-679
- de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:21-5
- de la Fuente van Bentem S, Anrather D, Dohnal I, Roitinger E, Csaszar E, Joore J, Buijnkink J, Carreri A, Forzani C, Lorkovic ZJ, Barta A, Lecourieux D, Verhounig A, Jonak C, Hirt H (2008) Site-specific phosphorylation profiling of *Arabidopsis* proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis. *J Proteome Res* 7: 2458-2470
- Dupeux F, Santiago J, Betz K, Twycross J, Park S-Y, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Jensen MR, Krasnogor N, Blackledge M, Holdsworth M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2011) A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *EMBO J* 30: 4171-4184
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349
- Falke JJ, Snyder EE, Thatcher KC, Voertler CS (1991) Quantitating and engineering the ion specificity of an EF-hand-like Ca²⁺ binding. *Biochemistry* 30: 8690-8697
- Feys BJ, Wiermer M, Bhat RA, Moisan LJ, Medina-Escobar N, Neu C, Cabral A, Parker JE (2005) *Arabidopsis* senescence-associated gene 101 stabilizes and signals within an enhanced disease susceptibility1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell* 17: 2601-2613
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45
- Flintoft L (2008) Global challenges: A sense of identity helps stressed-out plants. *Nat Rev Genet* 9: 414-414
- Franz S, Ehlert B, Liese A, Kurth J, Cazalé A-C, Romeis T (2011) Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 4: 83-96

- Franz Sandra (2008) Charakterisierung der CDPKs CPK21 & CPK23 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park S-Y, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu J-K (2009) *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462: 660-664
- Fujii H, Verslues PE, Zhu J-K (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 485-494
- Fujii H, Zhu J-K (2009) *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8380-8385
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3470-3488
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* 124: 509-525
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1988-1993
- Gao ZH, Krebs J, VanBerkum MF, Tang WJ, Maune JF, Means AR, Stull JT, Beckingham K (1993) Activation of four enzymes by two series of calmodulin mutants with point mutations in individual Ca^{2+} binding sites. *J Biol Chem* 268: 20096-20104
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4: ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KAS, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8023-8028
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, I. M, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21425–21430
- Gheysen G, Van Montagu M, Zambryski P (1987) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA-sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6169–6173
- Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405: 199-221
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Res* 38: W695-W699

- Grabarek Z (2006) Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol* 359: 509-525
- Guo J, Yang X, Weston DJ, Chen J-G (2011) Abscisic acid receptors: Past, present and future. *J Integr Plant Biol* 53: 469-479
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2000) CDPKs - A kinase for every Ca^{2+} signal? *Trends Plant Sci* 5: 154-159
- Harmon AC, Putnam-Evans C, Cormier MJ (1987) A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol* 83: 830-837
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33: 7278-7287
- Harper JF, Breton G, Harmon AC (2004) Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases *Annu Rev Plant Biol* 55: 263-288
- Harper JF, Harmon AC (2005) Plants, symbiosis and parasites: A calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 555-566
- Harper JF, Huang JF, Lloyd SJ (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33: 7267-7277
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* 51: 463-499
- Hegeman AD, Rodriguez M, Han BW, Uno Y, Phillips GNJ, Hrabak EM, Cushman JC, Harper JF, Harmon AC, Sussman MR (2006) A phyloproteomic characterization of *in vitro* autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics* 6: 3649-3664
- Hetherington AM (2001) Guard cell signaling. *Cell* 107: 711-714
- Hirayama T, Shinozaki K (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: Keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* 12: 343-351
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep* 39: 969-987
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* 24: 1695-1708
- Hubbard KE, Siegel RS, Valerio G, Brandt B, Schroeder JI (2012) Abscisic acid and CO_2 signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus–response analyses. *Ann. of Bot.* 109: 5-17
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389
- Johnsson B, Löfås S, Lindquist G (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198: 268-277
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J (2011) A brand new start: Abscisic acid perception and transduction in the guard cell. *Sci Signal* 4: re4-

- Kang J-Y, Choi H-I, Im M-Y, Kim SY (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14: 343-357
- Klingler JP, Batelli G, Zhu J-K (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot* 61: 3199-3210
- Knight H (1999) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 195:269-324
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61: 377-383
- Kretsinger RH, Nockolds CE (1973) Carp muscle calcium-binding protein. *J Biol Chem* 248: 3313-3326
- Kudla J, Batistič O, Hashimoto K (2010) Calcium signals: The lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22: 541-563
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The protein phosphatase *AtPP2CA* negatively regulates abscisic acid signal transduction in arabidopsis, and effects of *abh1* on *AtPP2CA* mRNA. *Plant Physiol* 140: 127-139
- Kumar S, Fladung M (2002) Transgene integration in aspen: Structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J* 31: 543-551
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21419-21424
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI (2004) Microarray expression analyses of arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16: 596-615
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J (1994) Arabidopsis ABA response gene *ABI1*: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* 49: 199-222
- Ma S-Y, Wu W-H (2007) *AtCPK23* functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Mol Biol* 65: 511-518
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064-1068
- Martin ML, Busconi L (2001) A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol* 125: 1442-1449
- Matsumoto S, Ito Y, Hosoi T, Takahashi Y, Machida Y (1990) Integration of agrobacterium T-DNA into a tobacco chromosome- possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. *Mol Gen Genet* 224: 309-316
- Maune JF, Klee CB, Beckingham K (1992) Ca^{2+} binding and conformational change in two series of point mutations to the individual $Ca^{(2+)}$ -binding sites of calmodulin. *J Biol Chem* 267: 5286-5295

- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C (1991) T-DNA integration- a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J* 10: 697-704
- McAinsh MR, Hetherington AM (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends Plant Sci* 3: 32-36
- Mehlmer N, Wurzinger B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R, Teige M (2010) The Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *Plant J* 63: 484-498
- Melcher K, Ng L-M, Zhou XE, Soon F-F, Xu Y, Suino-Powell KM, Park S-Y, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong E-L, Volkman BF, Cutler SR, Zhu J-K, Xu HE (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462: 602-608
- Melcher K, Zhou XE, Xu HE (2010) Thirsty plants and beyond: Structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling. *Curr Opin Struct Biol* 20: 722-729
- Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887
- Miyazono K-I, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang H-J, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira K-S, Yamaguchi-S. K, Tanokura M (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462: 609-614
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang Y-F, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+} -permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* 4: e327
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saik iR, Horn G, Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Biotechnology* 24: 17-27
- Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2011) The arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiol* 155: 553-561
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239-250
- Mustilli A-C, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089-3099
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Three arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* 50: 1345-1363

- Nakayama K, Okawa K, Kakizaki T, Inaba T (2008) Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stresses *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 1642-1645
- Nambara E, Suzuki M, Abrams S, McCarty DR, Kamiya Y, McCourt P (2002) A screen for genes that function in abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161: 1247-1255
- Nara M, Tanokura M (2008) Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 225-239
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126: 467-475
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326: 1373-1379
- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2007) ABA-hypersensitive germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in arabidopsis seed. *Plant J* 50: 935-949
- Nühse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2004) Phosphoproteomics of the arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell* 16: 2394-2405
- Ojo KK, Larson ET, Keyloun KR, Castaneda LJ, DeRocher AE, Inampudi KK, Kim JE, Arakaki TL, Murphy RC, Zhang L, Napuli AJ, Maly DJ, Verlinde CLMJ, Buckner FS, Parsons M, Hol WGJ, Merritt EA, Van Voorhis WC (2010) Toxoplasma gondii calcium-dependent protein kinase 1 is a target for selective kinase inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* 17: 602-607
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-FF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu J-K, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071
- Peterson FC, Burgie ES, Park S-Y, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang C-EA, Cutler SR, Phillips GN, Volkman BF (2010) Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1109-1113
- Plieth C, Hansen U-P, Knight H, Knight MR (1999) Temperature sensing by plants: The primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J* 18: 491-497
- Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiol* 52: 1569-1582
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15: 395-401
- Roberts DM, Harmon AC (1992) Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 375-414
- Rodriguez PL, Benning G, Grill E (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Lett* 421: 185-190

- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* 20: 5556-5567
- Romeis T, Piedras P, Jones JDG (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12: 803-816
- Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, Oecking C, Schaller A (2002) *LeCPK1*, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol* 129: 156-168
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* 37: 354-369
- Saha P, Singh M (1995) Characterization of a winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) protein kinase with calmodulin-like domain: Regulation by autophosphorylation. *Biochem J* 305: 205-210
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 23: 319-327
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14: S401-S417
- Santiago J, Dupeux F, Betz K, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Márquez JA, Rodriguez PL (2012) Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. *Plant Sci* 182: 3-11
- Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park S-Y, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2009a) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 462: 665-668
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park S-Y, Márquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL (2009b) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* 60: 575-588
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* 424: 439-448
- Schneider TD, Stephens RM (1990) Sequence logos: A new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18: 6097-6100
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001a) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* 52: 627-658
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001b) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410: 327-330
- Schulze C, Sticht H, Meyerhoff P, Dietrich P (2011) Differential contribution of EF-hands to the Ca^{2+} -dependent activation in the plant two-pore channel TPC1. *Plant J* 68: 424-432

- Sheen J (1996) Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274: 1900-1902
- Siegel RS, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A, Schroeder JI (2009) Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K^+ channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* 59: 207-220
- Sigrist CJA, Cerutti L, de Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Bulliard V, Bairoch A, Hulo N (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* 38: D161-D166
- Sirichandra C, Gu D, Hu H-C, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Kwak JM (2009) Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* 583: 2982-2986
- Soon F-F, Ng L-M, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MHE, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong E-L, Cutler S, Zhu J-K, Griffin PR, Melcher K, Xu HE (2012) Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* 335: 85-88
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* 61: 25-35
- Tracy FE, Gilliam M, Dodd AN, Webb AAR, Tester M (2008) NaCl -induced changes in cytosolic free Ca^{2+} in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ* 31: 1063-1073
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* 51: 1821-1839
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17588-17593
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11632-11637
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder J, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487-491
- Vahisalu T, Puzõrjova I, M. B, Valk E., Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, Loog M, Kangasjärvi J, Kollist H (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves production of reactive oxygen species and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 62: 442-453
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45: 523-539

- Vitart V, Christodoulou J, Huang J-F, Chazin WJ, Harper JF (2000) Intramolecular activation of a Ca²⁺-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. *Biochemistry* 39: 4004-4011
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Laurière C, Merlot S (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in arabidopsis. *Plant Cell* 21: 3170-3184
- Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151: 119-123
- Weljie AM, Clarke TE, Juffer AH, Harmon AC, Vogel HJ (2000) Comparative modeling studies of the calmodulin-like domain of calcium-dependent protein kinase from soybean. *Proteins* 39: 343-357
- Wernimont AK, Amani M, Qiu W, Pizarro JC, Artz JD, Lin Y-H, Lew J, Hutchinson A, Hui R (2011) Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins* 79: 803-820
- Wernimont AK, Artz JD, Finerty P, Lin Y-H, Amani M, Allali-Hassani A, Senisterra G, Vedadi M, Tempel W, Mackenzie F, Chau I, Lourido S, Sibley LD, Hui R (2010) Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nat Struct Mol Biol* 17: 596-601
- Witte C-P, Keinath N, Dubiella U, Demoulière R, Seal A, Romeis T (2010) Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated *in vivo* as part of a kinase cascade that regulates stress response. *J Biol Chem* 285: 9740-9748
- Witte CP, Noël L, Gielbert J, Parker J, Romeis T, (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol* 55: 135-147
- Wu F-H, Shen S-C, Lee L-Y, Lee S-H, Chan M-T, Lin C-S (2009) Tape-arabidopsis sandwich - a simpler arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* 5: 16-26
- Xu J, Tian Y-S, Peng R-H, Xiong A-S, Zhu B, Jin X-F, Gao F, Fu X-Y, Hou X-L, Yao Q-H (2010) *AtCPK6*, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. *Planta* 231: 1251-1260
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57: 781-803
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1230-1236
- Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1565-1572
- Yoon GM, Sun CH, Jung HH, Ryol LJ, Pai LH-S (1999) Characterization of *NtCDPK1*, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol Biol* 39: 991-1001
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 43: 1473-1483
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2006) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (*AtPP2CA*) that

strongly regulates abscisic acid signaling during germination among arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* 140: 115-126

Zhang W, Ruan J, Ho T-HD, You Y, Yu T, Quatrano RS (2005) Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 21: 3074-3081

Zhao R, Sun H-L, Mei C, Wang X-J, Yan L, Liu R, Zhang X-F, Wang X-F, Zhang D-P (2011a) The arabidopsis Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytol* 192: 61-73

Zhao R, Wang X-F, Zhang D-P (2011b) CPK12: A Ca^{2+} -dependent protein kinase balancer in abscisic acid signaling. *Plant Signal Behav* 6: 1687-1690

Zhao Y, Chow TF, Puckrin RS, Alfred SE, Korir AK, Larive CK, Cutler SR (2007) Chemical genetic interrogation of natural variation uncovers a molecule that is glycoactivated. *Nat Chem Biol* 3: 716-721

Zhao Y, Pokutta S, Maurer P, Lindt M, Franklin RM, Kappes B (1994) Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. *Biochemistry* 33: 3714-3721

Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273

Zhu S-Y, Yu X-C, Wang X-J, Zhao R, Li Y, Fan R-C, Shang Y, Du S-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Xu Y-H, Zhang X-Y, Zhang D-P (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in arabidopsis. *Plant Cell* 19: 3019-3036

Zou J-J, Wei F-J, Wang C, Wu J-J, Ratnasekera D, Liu W-X, Wu W-H (2010) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca^{2+} -mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol* 154: 1232-1243

7 Anhang

Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide	XVIII
Anhang 2: Genomische Sequenz von CPK21 und CPK23	XXIII
Anhang 4: Alignment der Proteinsequenz von CPK21 und CPK23	XXVIII
Anhang 5: Die häufigsten verwendeten Expressionsvektoren.....	XXVIII
Anhang 6: Statistische Analyse Anzahl an chlorotischen Pflanzen nach dem Logit-Modell mit SPSS	XXX
Anhang 7: Lebenslauf.....	XXXIII
Anhang 8: Veröffentlichungen die aus dieser Dissertation hervorgegangenen sind	XXXIV
Anhang 9: Poster, Präsentationen und Veröffentlichung.....	XXXIV

Anlagenverzeichnis

Anlage 1: Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen.....	XVIII
Anlage 2: Oligonukleotide zur Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien <i>cpk21-1</i> und <i>cpk23-1</i>	XIX
Anlage 3: Oligonukleotide zur Klonierung über Restriktionsschnittstellen	XXI
Anlage 4: Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR.....	XXII
Anlage 5: <i>CPK21</i> , AT4G04720.1, genomische Sequenz:	XXIII
Anlage 6: <i>CPK23</i> , AT4G04740.1, genomische Sequenz:	XXV
Anlage 7: Allignment der Proteinsequenz von CPK21 und CPK23.	XXVIII
Anlage 8: Generierte Expressionsvektoren.....	XXIX

Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide

Anlage 1: Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Anneling-Temperatur	Produktlänge (cDNA) in bp
cDNA-Mengen-Anpassungskontrolle			
Aktin2 fw	GTGAACGATTCTGGACCTGCCTC	55 °C	528
Aktin 2 rw	GAGAGGTTACATGTTACCCACAAC		
Abiotischer Stress und ABA-abhängige Markergene			
RD29A fw	CTCCTTCTGCACCGGAACAACAGTG	55 °C	517
RD29A rw	CTCCGGTCAATGAGAAGGATCAAG		
RD29B fw	CTGCTTGCTCATGACCATAAGGAC	55 °C	812
RD29B rw	GTCTTCTTCTCTCCTCCTCTCC		
COR15A fw	CTTTGTGGCATCCTTAGCCTCTCC	55 °C	366
CPR15A rw	CTCAGGAGCTGTTCTCACTGGTATG		
DREB1A fw	CCATAACGATACGTCGTCATCATC	55 °C	459
DREB1A rw	GTGGGTTTGTGAGGTTAGAGAAC		
Nachweis des <i>CPK21</i> - und <i>CPK23</i> -Transkripts			
CPK21 fw	CCCATGACTCAACCAATCCATCAGC	55 °C	604
CPK21 rw	CTCCCAACTATATCCCGGTAAAC		
Ein Oligonukleotid bindet 5' und eins 3' der T-DNA			
CPK23 fw	CACTGTGTTATCACGTATGAAGC	55 °C	544
CPK23 rw	GTGGAATGGATACTGTTCCCTT		

Fortsetzung Anlage 1

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Anneling-Temperatur	Produktlänge (cDNA) in bp
Beide Oligonukleotide binden 5` von der T-DNA			
CPK23 fw2	CCCATCACCATCGATACCCATCTC	55 °C	569
CPK23 rw2	CTCCAACCACATCCTTGTAAG		
Beide Oligonukleotide binden 3 der T-DNA			
CPK23 fw3	cctgaaggaatatgaatg	55 °C	155
CPK23 rw	GTGGAATGGATACTGTTCCCTT		
Ein Oligonukleotid bindet 5` und eins in der T-DNA			
CPK23 fw	CACTGTGTTATCACGTATGAAGC	55 °C	430
T-DNA-RB	GTGACTCCCTTAATTCTCCGCT		

Anlage 2: Oligonukleotide zur Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien *cpk21-1* und *cpk23-1*.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Anneling-Temperatur	Produktlänge in bp
Charakterisierung der <i>cpk21-1</i>			
<i>CPK21</i> genomische Sequenz			
CPK21 fw2	caccATGGGTTGCTTCAGCAGTAAAC	58 °C	ca. 1200
CPK21 rw2	CCGTAAC TTCGCCTTAATACTT		
T-DNA 5`			
CPK21 fw2	caccATGGGTTGCTTCAGCAGTAAAC	58 °C	ca. 500
T-DNA-LB	TGGTTCACGTAGTGGGCCATC		
T-DNA3`			

Fortsetzung Anlage 2

Bezeichnung	Sequenz (5' -3')	Anneling-Temperatur	Produktlänge in bp
T-DNA-LB	TGGTTCACGTAGTGGGCCATC	58 °C	ca. 1500
CPK21 rw	CTCCCAACTATATCCCGGTAAAC		
Charakterisierung der <i>cpk23-1</i>			
<i>CPK23</i> genomische Sequenz			
CPK23 fw	CACTGTGTTATCACGTATGAAGC	58 °C	ca.1200
CPK23 rw3	GGCTGTATTGTGCACATACTTGTC		
T-DNA 5`			
CPK23 fw	CACTGTGTTATCACGTATGAAGC	55 °C	ca. 800
T-DNA-RB	GTGACTCCCTTAATTCTCCGCT		
T-DNA3`			
T-DNA-LB	TGGTTCACGTAGTGGGCCATC	58 °C	ca. 800
CPK23 rw3	GGCTGTATTGTGCACATACTTGTC		

Anlage 3: Oligonukleotide zur Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`)	Anneling-Temperatur	Produktlänge in bp
CPK23 fw	gaattcATGGGTTGTTTCAGCAGTAAAC	55 °C	1572
CPK23 rw	cccgggGTGGAATGGATACTGTTTCCCT		
SLAC1-NT fw	aagcttATGGAGAGGAAACATCAGTCAAATGC	55 °C	570
SLAC1-NT rw	cccgggTAGGAGAAACGGCCATTGC		
SLAC1-CT fw	aagcttATGCACGCCTTTGTCTGGC	55 °C	197
SLAC1-CT rw	cccgggGTGATGCGACTCTTCCTCTGC		
cpk21 CLD frw	gatatcGCGGAGAGTCTATCAGAAGAGG	55 °C	476
CPK 21 rw (mit STOP)	gaattcTCAATGGAATGGAAGCAGTTTC		

Anlage 4: Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`) (Mutation in große Buchstaben)	Anneling-Temperatur
CPK23 ΔEF1 fw	gtttgcgaatatggCtaccGCtagaagcgggaca	60 °C
CPK23 ΔEF1 rw	tgccccgcttctaGCggtaGccatattcgcaaac	
CPK23 ΔEF2 fw	tgaagcgtctgCtgtggCtggaatggaacaa	60 °C
CPK23 ΔEF2 rw	ttgtccattaccaGccacaGcagacgcttca	
CPK23 ΔEF3 fw	cattccaacacttagCtaaagCcaaaaatgggcacata	60 °C
CPK23 ΔEF3 rw	tatgtgccattttgGctttaGctaagtgttggaatg	
CPK23 ΔEF4 fw	tatccgaagttgCcaccgCcaatgatggaaa	60 °C
CPK23 ΔEF4 rw	ttccatcattgGcggtgGcaactcggata	
CPK23 Q393E fw	caatcacttatgaaGaactccaaactgg	60 °C
CPK23 Q393E rw	ccagtttgaggttCttcataagtgattg	
CPK23 S362I fw	gccctaaagggttaTcgcggtgagtctatc	60 °C
CPK23 S362I rw	gatagactcaccgcgAtaaccttagggc	
D193A fw	gtgtgattcatcgagCtctcaagcctgag	60 °C
D193A rw	ctcaggcttgagaGctcgatgaatcacac	

Anhang 2: Genomische Sequenz von CPK21 und CPK23

Anlage 5: CPK21, AT4G04720.1, genomische Sequenz:

Exons: Grün; Introns: Schwarz, 5`- und 3`-UTR: Unterstrichen Start und Stop-Codon: Gelb unterlegt.

1 AATTCCAATT CCAGTCAAAC AAAACCTTCA CAACTCAATT ATTCTTCCGA
 51 TTTTGGTTTC TCTCTTCAA TCATCCTTCA AGCTCATCTT TTTCTTCTAC
 101 CCAATAACGA AAGTCTCCTC CTTTACTAAT **G**GGTTGCTTC AGCAGTAAAC
 151 ACCGAAAAC TCAAACGAC GCGGAGAAA AATCAATCCC GATCAATCCA
 201 GTTCAAACCC ATGTAGTCCC CGAGCATCGT AACCTCAA CCCCACACC
 251 AAAACCCATG ACTCAACCAA TCCATCAGCA GATTCAACA CCGTCTTCAA
 301 ATCCAGTCTC AGTTCGAGAT CCAGATACGA TTTTAGGTAA ACCATTCGAA
 351 GACATCAGGA AATTTTACAG CTTGGGGAAA GAATTAGGTC GAGGTCAATT
 401 TGGGATTACG TATATGTGTA AAGAGATTGG TACTGGTAAC ACTTATGCTT
 451 GCAAATCGAT TCTTAAGAGG AAGCTAATTA GTAAGCAAGA TAAAGAAGAT
 501 GTGAAGAGAG AGATTCAGAT AATGCAGTAT TTGTCTGGAC AACCTAACAT
 551 TGTTGAGATC AAAGGTGCTT ATGAAGATAG ACAATCTATA CATTGGTTA
 601 TGGAGTTGTG TGCTGGTGGT GAGTTGTTTG ATAGGATTAT AGCTCAAGGT
 651 CATTACTCTG AGAGAGCTGC TGCTGGTATC ATTAGGTCTA TTGTCAATGT
 701 TGTTCAAGATT TGTCATTTA TGGGTGTGGT TCATCGAGAT CTCAAGCCTG
 751 AGAATTTCTT GCTTTCGAGT AAAGAGGAGA ATGCTATGCT TAAAGCTACT
 801 GATTTCCGGT TGTCCTTCTT CATCGAAGAA GGTTAGCTAG AGACTCAATA
 851 TAGCCTTTTT TGGTCTTTGG TTTTGGATTG TTAGTGTTTG GAATCTATAA
 901 GCTTGTCTAG TCTCTTTAGT GTCAAAGATT AAGAGTTTGG TAGTTCATTG
 951 CATTGTGATC TCTAGCTTGA GTACTTCTTG TTTTCGAGTA ACAGTGAGAG
 1001 TGTCATGGTC AAAACAATTG ATTTTGTGTT TTCTCTGTTT ATTGAAGATT
 1051 GATCATATTC TTTGGTATTT AAGATCTGCA CTTTTTTTTT CCGTTGATCA
 1101 TGAGCTAGAT TGTTGTCTTA TGTTCCAATG CATAGGGATG AGACTCAAGA
 1151 CACTTTAGTA CCGAGAATCG AGTTTATCTT GTCTTTTGTA CACATCTTTA
 1201 TGATATTGTC AAGTATGTAA TTTTCATTAG TTTGATTCTT ATGTTAATAT
 1251 GCTTCATGAT ATGTCTGTGA AACCAACAAA TGCAGGAAAA **GTTTACCGGG**
 1301 **ATATAGTTGG GAGTGCTTAC TACGTTGCTC CAGAAGTATT AAGGCGAAGT**
 1351 **TACGGAAAAG AAATCGACAT TTGGAGTGCA GGTGTCATTT TATACATCCT**
 1401 **ACTCAGCGGT GTACCTCCTT TTTGGGCCGG TAAAAGACCT TTAAGCTAAC**
 1451 CAAATTCATT GATTTGTTTT CTTCTTGAGG TGTGATCTAT ATTCATATGT
 1501 TATATTTTAG **AAAATGAGAA AGGAATATTC GATGAGGTCA TAAAAGGCGA**
 1551 **AATTGATTTT GTAAGTGAGC CATGGCCTTC TATATCTGAA AGCGCGAAAG**
 1601 **ATCTTGTTAG GAAGATGCTA ACCAAAGACC CGAAGAGACG AATCACGGCT**

1651 GCACAGGTTT TGGTAAGAC AATGTGAATA CCAGTATTTT TTTCCCACTC
1701 CTGTTTGTAT AGAATGCGTG ATTACATATT TTAGAGGCTC AAAGCCAGAA
1751 CAAGATAGTC AGTCCATTGT ATAGGACCTC TAGGTCTAAA TAGACTCTAG
1801 TGAATGTTGA AGTCTGATCT TGTTCTTGTC TTTGAGTTTA TGGTCGTCTA
1851 ACTAGTAATG CTTTACTAAT ATGTAGCCAT CCTTATGGTT TATAGAACAT
1901 CCTTGGATCA AAGGGGAGA AGCACCAGAC AAGCCTATTG ATAGCGCTGT
1951 GTTATCCCGC ATGAAGCAAT TCCGAGCAAT GAACAAGCTT AAGAAGCTAG
2001 CTCTAAAGGT AAAGAAGTGG CTGAAATTTT TTATGAAATT ATCTTTCTTT
2051 ATTACTAATT TTGCATTTCA ATTATCCACT TGCAATCTCT CTATGCTCCA
2101 TATTGCAATG CCTCATATCT ACTGGTGCCT GAAATTTTGG TTGTAATTTG
2151 TGTATTCTGT TTTTCAAGTTA TCGCGGAGAG TCTATCAGAA GAGGAGATTA
2201 AAGGTCTTAA AACCATGTTT GCGAATATAG ATACCGACAA AAGCGGGACA
2251 ATCACTTATG AAGAACTCAA AACTGGGCTA ACTAGACTTG GGTCTAGACT
2301 CTCGGAAACT GAAGTTAAGC AACTCATGGA AGCCGTAAGT TATCTTCAGC
2351 ATCTTGGCTT CACTTTCCAC TGTTAAGGTT TTGAAAAGC TTGAAACACA
2401 TGATGATAAC GTTTCAGGCT GACGTCGATG GTAATGGAAC AATCGACTAC
2451 TACGAGTTTA TCTCTGCGAC AATGCATAGA TACAAATTAG ATCGAGATGA
2501 GCATGTATAC AAAGCATTCC AACACTTTGA TAAAGACAAC AGCGGGTAAG
2551 TTTTCCATT TTCAGTTTAT GAATTAGTCT CCATTGTTCA TTTCTTGTGT
2601 CATGGAGACT AAGTATCAGA TGTGTACAAC TATTATCATG CACCAATGTT
2651 AATAATGGCT TGGTTATACA ACAGGCACAT AACTAGAGAT GAGTTGGAAA
2701 GTGCCATGAA GGAATATGGA ATGGGAGATG AAGCTAGCAT CAAAGAAGTT
2751 ATATCCGAAG TTGATACCGA CAATGTAAGT TGCACTCTCT AACATATAAG
2801 CCAACATCTC AAACATTAAA CTGGTTCTTG AAACCTTGTA ATGAACTATG
2851 TTACAGGATG GAAGAATAAA CTTTGAAGAA TTTTGCGCGA TGATGAGAAG
2901 TGGCAGCACG CAGCCACAGG GGAAACTGCT TCCATTCCAT TGATCAAGTC
2951 GGCATAAATC CCAACGGTTT ATCAACCGAA AGCGATTCTT GAACCCAGAG
3001 TAGAAGAGCT AAACCGGGG TAAACCGAGG TGAGCATAGT TGATATACTG
3051 TCTCAAATG TTGTTCTATC TTCTCTGTGT TTGAACAGAT TTATTTATCC
3101 TTCTCCTTAG TTAGTCTGAA ACTGATTTTG AGAGACTGTC ATGTCTTAGC
3151 TCCTTGTAAC AGTAACATAT CCACTTATAT TTTTTGAAA CTTTCTTGAG
3201 AACTTTCTTA ATCCTTATGA GCTTTAAGTG TAATCTTTTG CTAGTAATAG
3251 TTCTTAGGA ATCTCTCTTA TCACTTCTCA ATCCAAGATA CAACTCAAG
3301 AA

Anlage 6: *CPK23*, AT4G04740.1, genomische Sequenz:

Exons: Grün; Introns: Schwarz, 5'- und 3'-UTR: Unterstrichen Start und Stop-Codon: Gelb unterlegt.

1 AATTCTAAGG CCCAATTAAG GCCTCCAGAG CAGCCCAATC TGAGATCTCG
 51 ATATATTTTT TCCGGTATAT GAAAAAAAAG TCCAAAATCC AGCTCAAAT
 101 TCAAATCTTT CAAAAATTTT TTACAGTTTCG AGTCAAACAT ATACAATAAT
 151 ACAAACCACA AATGTGTTCT CAATCAAATT CCTCCAAGTT TATCTTCTTC
 201 TTCAATCCAA GAAGAAAGTC TACGAAAAGT CTCCTCCTTT ACTAATGGGT
 251 TGTTTCAGCA GTAACACCG GAAAAC TCAA AACGACGGCG GCGGAGAAAG
 301 ATCAATTCCG ATAATTCCAG TTCAAACCCA TATCGTTGAT CAAGTCCCCG
 351 ATCATCGTAA ACCTCAAATC CCATCACCAT CGATACCCAT CTCAGTTCGA
 401 GATCCAGAGA CGATTTTAGG TAAACCATT GAAGACATCA GAAATTTTA
 451 CAGCTTGGGG AGAGAATTAG GTCGAGGTGG TTAGGGATT ACGTATATGT
 501 GCAAAGAGAT TGGGACTGGG AACATTTATG CTTGCAAATC GATTCTCAAG
 551 AGGAAGCTAA TTAGTGAGCT GGGTAGAGAA GATGTGAAGA CAGAGATTCA
 601 GATCATGCAG CATTTGTCTG GACAACCAA CGTTGTTGAG ATCAAAGTT
 651 CTTATGAAGA CAGACATTCT GTACATTTGG TAATGGAATT ATGTGCCGGT
 701 GGAGAGTTGT TTGATAGGAT TATAGCTCAA GGTCATTA CTGAGAGAGC
 751 TGCTGCTGGT ACCATTAAGT CAATTGTGGA TGTTGTTGAG ATTTGTCATT
 801 TGAATGGTGT GATTCATCGA GATCTCAAGC CTGAGAATTT CTTGTTCTCG
 851 AGTAAGGAGG AGAATGCAAT GCTTAAAGTA ACCGATTTG GGTTGTCCGC
 901 GTTTCATCGAA GAAGGTTAGC TATAGAGATT GATCTTTTAT AGAATCATCT
 951 TAGGTTGATT TGGTATGCTA ATGGTACGAA TCTATAGATT GTCTTGACACA
 1001 AGTCTCTTTA GTATCTACAT TCATCTTAGG AGTTCACTGA ATCGTGATGT
 1051 CATATACTCT AGAATAAGAA TAGAATGTTA TGCATAAAGG AGTCCGATTT
 1101 GAAATTGATA GGTGGTCCCT CCTCAAAGCC AAAGAGATGT GTTTTGTCTT
 1151 AACACAAGAA CACACAAAGT ACCAAAGAGA TAAACTCTGT TTTGTCATTT
 1201 TTCAAGTCTG ATTCCTTAAC TTGACATTGA AGTCTTTAAA TACACAAAAA
 1251 TAAGAAAGAA AATAACCACT AAATCTACTA CTAACATCGT GGGGAGTGGA
 1301 GAATACAATC CCATTAATTT AGGAGCCATA ACAAGACCAC ATCTCTTTTC
 1351 TATGACACCG GTTTACTCTG GTTATGTGCT TATCAGAAAT GTTCTGTGTT
 1401 CATTGAATAA AGTGAGCTCG AGATTGATCA TATTCTTAGT GTATTGATGA
 1451 TTGCGTTTGA TAGGTTTTGG GTCCTATAGG ATTGTCTAGC ACAAATCTCT
 1501 TTTAGTATCA AGTACTTGTT TTGAGTAAC GATGAGACTG TTATGCTCAA
 1551 AGCAATTGAT TTTGGGGTTT CTCTGTTTCA TGAAGATTGA TCATATTCTT
 1601 TCACGAATCG AAAATATGCA CTTTGTGCTT TAATCATGAG CTAGATTGGT
 1651 GACTTATGTT CCAATGCATA GAGATGGGAC TCTACTCTTT AGTAATAGAA

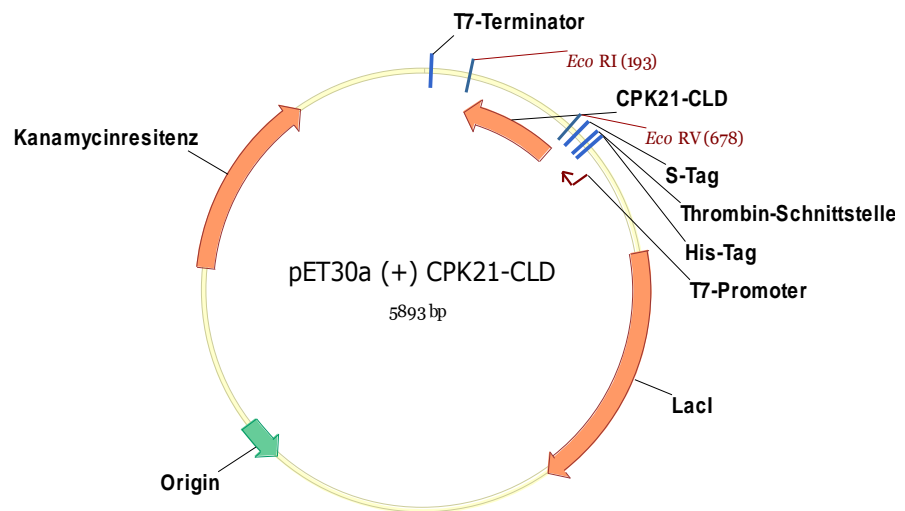
1701 TCAGGTTTAT GTTGTCTTAT TATTGTACAG ATTAACTAT GTTTATGTTT
1751 TCGTTTTAGT TTATTTTGAT TTTTATGTTT ATCTGTTTGT GAAACCAAAA
1801 TTACAGGAAA AATTTACAAG GATGTGGTTG GGAGTCCTTA CTACGTTGCT
1851 CCTGAAGTAT TAAGGCAGAG TTACGGAAAA GAAATCGACA TTTGGAGTGC
1901 AGGTGTTATT TTATACATCC TACTCTGCGG TGTACCTCCT TTTTGGGCCG
1951 GTAAAAGACC TTTAAGCTAA CAAAACCTTCT TGATTTTTTC TTCTTCTTCT
2001 TAAGGTTTGA TCTGTAATCA TATGTTATTT TGTAGACAAT GAAGAAGGAG
2051 TATTCGTTGA AATTCTAAAA TGCAAAATTG ATTTTGTACG TGAGCCATGG
2101 CCTTCTATAT CTGACAGCGC GAAAGATCTT GTTGAGAAGA TGCTAACCGA
2151 AGACCCTAAG AGACGAATCA CTGCTGCACA AGTTCTTGGT AAGAGAATGT
2201 GAATACCAGT CTTGAGTTTA TGGTCGTTTA CCGAGTAATG CTTTACTAAT
2251 ATGTAGCAAT CTTTATGGTT TATAGAACAT CCTTGGATCA AAGGGGGAGA
2301 AGCACCGGAA AAGCCTATTG ATAGCACTGT GTTATCACGT ATGAAGCAAT
2351 TCCGAGCAAT GAACAAGCTT AAGAAGCTAG CCCTAAAGGT AATCACGTAG
2401 CTCAAATAT TATGAAATTA AATCTTTCTT TATTACTAAT TATGCATCTC
2451 GCTTATAGTC TTTCCATCTC TTTGTGTTCT CTAATCAGTT GAAACATCTC
2501 ATATCTACTA GTGCCGGAAC TTGGGGATCT AATTTGTGTG TTCTGTTTGC
2551 AGGTTAGCGC GGTGAGTCTA TCCGAAGAAG AGATCAAAGG TCTTAAAACC
2601 TTGTTTGCGA ATATGGATAC CAATAGAAGC GGGACAATCA CTTATGAACA
2651 ACTCCAAACT GGGCTAAGTA GACTTAGATC TAGACTCTCT GAAACTGAAG
2701 TTCAGCAACT CGTTGAAGCG GTAAGTTATC TTCAGCATCT TGCTTTCTCT
2751 TTTCCGCAAT TAAGATCTTG AAAAAGACAG TTTGAAACAC ATGATGATAA
2801 CTTTTAGTC TGATGTGGAT GGTAATGGAA CAATTGACTA CTATGAGTTT
2851 ATCTCTGCGA CAATGCATAG ATACAAATTA CATCACGATG AGCACGTACA
2901 CAAAGCATTG CAACACTTAG ATAAAGACAA AAATGGGTAA GTTTCTTACA
2951 TTTTCAGTGT ACGAATCAAT CATTCTTTT TTTTGTCAA GAGGATTAAG
3001 ATTCAAATGT GTGTAECTAT TATGAGGCAC CAATGTTAAT GCTATTTGGT
3051 AATCCAATAG GCACATAACT AGGGATGAGT TGGAAAGTGC CATGAAGGAA
3101 TATGGAATGG GAGATGAAGC TAGCATCAAA GAAGTTATAT CCGAAGTTGA
3151 CACCGACAAT GTAAGTCGCA CTCTCTAACA TAATCCAACA TCTCAAACAG
3201 TAAACCGGTG CTTGTAATGA AACCTTGAAA GGAECTATGT TACAGGATGG
3251 AAAAATAAAC TTTGAGGAAT TTCGTGCGAT GATGAGATGT GGCACCACAC
3301 AACCAAAGG GAAACAGTAT CCATTCCACT GACCAAGACT ACATAGATCC
3351 AACGGAAAGT AATTCTTAAA CATGGAAAAC TCAAACGAC GGTGGCAAAA
3401 GATGAATCAA CCAAGCCATC AACAGATTTT CAACACCGTC TACAAACCCA
3451 ATCTCAGTTC GAGATATATC AATGGGAGAT ATATCGAATG GTTACAAAAC
3501 TGGACAAGTA TGTGCACAAT ACAGCCTTCG AATTCAGTCC TTCTCGCAAT

3551 GAAAGTCAAT ATCTTGGAGT AGATGATGAC TGAGAATTGG TGGACATTTT
3601 TAGGCTTTAT CTCCAGTGGG AATCATGAGA GAGGTTGCGT TAGGTAAAAT
3651 TGATAATATG TCGAGACAGA TAGCAATCAT GAGACTTTGT GATCACACTG
3701 CTTAGAAAGG GGAGATAAGT GTTTTAGAGA TTAGAGAAAT CCAGCCGTTG
3751 TTCATCTTTG GCCTTGCAGA AATAGGAGTT CCAGTGAACA CATTCAAGCA
3801 AAACAATGTT CAGGAAGATG GTTTATATCT TCCAGTGCTT AACAAATGCGG
3851 CTTGATGATA AAGATTGCCG TTTATAATCT TCTTCCAGAG ATTTACAGAA
3901 ACCTAGACTC ACCAAGAGAC TCGTTGGAAG ATAACAATTG ATGGGTCTTG
3951 GCACTTACGG GTGCGTTCTG TGCAGCAATT AATTTGAGAT AGATCTCAAG
4001 TCACGCTGGA TACTTTATGG AGATTGCATA TAAGATGATA GATGAATACT
4051 TTATCCGAAG CTTTTTGTGA ATTTGCGATC TGATTTCTAT GAAATCGATC
4101 TTCTGGAATG AGGTAAAAAA ACATCTCAAT CCGATCATGT GGTTTGCTAA
4151 TTCTGTCGAG AGTTTCTCTT TTCCATTGGT CGAAATCGAT AAGATTGAAT
4201 GGTAGAATAT AACATATTTG TGTGTTTTTC GATTGAATAG TCTAACAAGG
4251 ATTCTTGATT TGGTTTTAGG ATGATGGATT CATGAAAGTT TTCTAGGTAA
4301 GAGATTTCAA TCTCTTTGCG AATTTAAGG AGATTCAGGT AAAAGAGATT
4351 GATTTGAAAT GTTGTTGCAT TATTCCATGT TCTATTGACT CCAAATCGTT
4401 AGTCAATTGC CTATTGAGTT GTTTAGGGAT ACATTGTAGA AGAACTAGG
4451 ACACCTATGA CTGGCTTTAC ATTTTGGTG CTTTCCATTG TGCAGCTTGC
4501 ATGGTATTAA ATCCCTCAAG GTATGCATTC TTTGTAATAT TCTCCAATCT
4551 CTTAAGAGAA TCTTATTGAT TTGATGCACT TTATGTTATA TGCTTCTGAT
4601 TTGCCTTTTT CCTGCGTTTG TCAAATACTC AAAATATACA GAAATGATCT
4651 GAAAAGTCAA AGGAATTTGA ATTTGAGTAG TTGTAACTT AGTAATAACT
4701 TTATCTTGCA TCTACATTTT CTCAACATCC TTAGGAACCC TTTGAGCATC
4751 AAAAATTTTA TTACGACTCT AATGTACTAT CCTGATGGGA TGAATATAGA
4801 GATAAATCTG AGATTCTGAG GATCTGAGAA ACAGATGTAG ACCTGAAGAA
4851 GATGACTTTG GCGATATTGT CCAACTTCTA TATGTGTTTT ATTCTTTCAG
4901 TTTATAGCCA TCATTCCTCA TATGTACTTT ATTGATGCAA TCTATACCTG
4951 AAATCTTCTT TTCAGTTTGA CGAGCACCAG ATGACCAAGA TAAAAAAAT
5001 GAGCAGAGGA ATTACGGGTA GAGTCAGAGA GTTGCATTAG GCAAGTGCTT
5051 ACACTTTGTC TACGTTCTTG AATCAGTAAA CGATCTTGCT CAAGTCATGA
5101 TGGATCTTTC TGCACCTGTG ATAGATCAG

Eine Spleice-Variante der CPK23 AT4G04740.2 wird in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

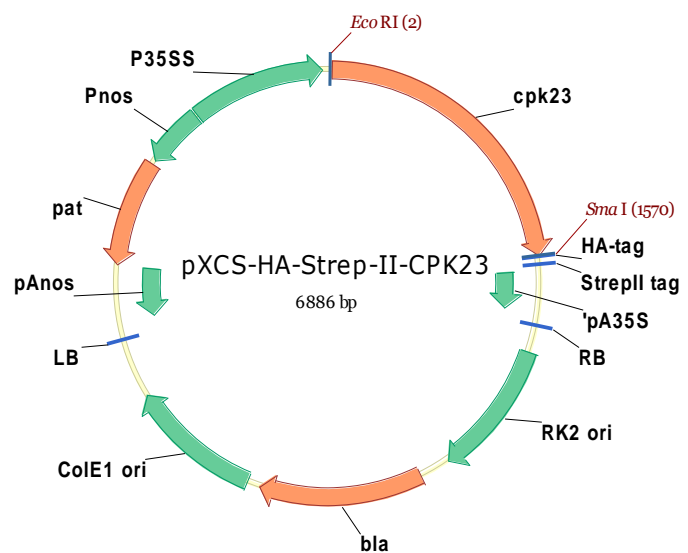
(B) pET30a (+) mit den Inserts:

CPK21-CLD, CPK21-CLD Δ EF1, CPK21-CLD Δ EF2, CPK21-CLD Δ EF1/2, CPK21-CLD Δ EF3, CPK21-CLD Δ EF4 und CPK21-CLD Δ EF3/4.



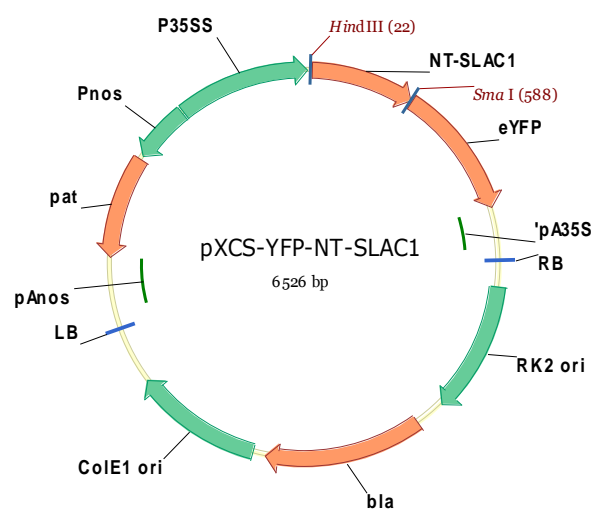
(C) pXCS-HA-Strep mit dem Inserts:

CPK23, CPK21, CPK21D204A, CPK21, CPK21vk, CPK21vkD204A und NT-SLAH3.



(D) pXCS-YFP mit dem Inserts:

NT-SLAH3 und CT-SLAH3.



Anhang 6: Statistische Analyse Anzahl an chlorotischen Pflanzen nach dem Logit-Modell mit SPSS (Abschnitt 3.1.2)

Vergleich Col-0 mit *cpk21-1*

Frequency Table

Genotyp

Genotyp		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Col-0	40	50,0	50,0	50,0
	<i>cpk21-1</i>	40	50,0	50,0	100,0
	Total	80	100,0	100,0	

Chlorotisch

Chlorotisch		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	0	50	62,5	62,5	62,5
	1	30	37,5	37,5	100,0
	Total	80	100,0	100,0	

Platte

Platte		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	34	16	20,0	20,0	20,0
	36	16	20,0	20,0	40,0
	37	16	20,0	20,0	60,0
	46	17	21,3	21,3	81,3
	47	15	18,8	18,8	100,0
	Total	80	100,0	100,0	

Logistic Regression

Syntax	LOGISTIC REGRESSION/ Logit-Modell VARIABLES Chlorotisch /METHOD=FSTEP(COND) Platte Genotyp /CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10) ITERATE(20) CUT(.5).
--------	---

Anmerkung: Es wird getestet ob die Einbeziehung der Variablen Genotyp und Platte einen Einfluss auf die Ausprägung des Merkmals Chlorotisch hat. Genotyp kann die Ausprägung *cpk21-1* und Col-0 annehmen. Die Variable Platte bezeichnet die einzelnen 1 MS-Platten mit 300 mM Mannitol und 3% Saccharose.

Block 0: Beginning Block keine Variable einbezogen**Classification Table^{a,b}**

Observed			Predicted		
			Chlorotisch		Percentage Correct
			0	1	
Step 0	Chlorotisch	0	50	0	100,0
		1	30	0	0,0
Overall Percentage					62,5

a. Constant is included in the model.

b. The cut value is .500

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0	Constant	-,511	,231	4,893	1	,027	,600

Variables not in the Equation

			Score	df	Sig.
Step 0	Variables	Platte	,010	1	,919
		Genotyp	13,653	1	,000
Overall Statistics			13,666	2	,001

Block 1: Method = Forward Stepwise (Conditional)**Omnibus Tests of Model Coefficients**

		Chi-square	df	Sig.
Step 1	Step	14,204	1	,000
	Block	14,204	1	,000
	Model	14,204	1	,000

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	91.646 ^a	,163	,222

a. Estimation terminated at iteration number 4 because parameter estimates changed by less than .001.

Classification Table^a

Observed			Predicted		
			Chlorotisch		Percentage Correct
			0	1	

Step 1	Chlorotisch	0	33	17	66,0
		1	7	23	76,7
	Overall Percentage				70,0

a. The cut value is .500

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1 ^a	Genotyp	-1,853	,525	12,463	1	,000	,157
	Constant	2,155	,763	7,976	1	,005	8,629

a. Variable(s) entered on step 1: Genotyp

Model if Term Removed^a

Variable	Model Log Likelihood	Change in -2 Log Likelihood	df	Sig. of the Change
Step 1 Genotyp	-53,073	14,499	1	,000

a. Based on conditional parameter estimates

Variables not in the Equation

		Score	df	Sig.
Step 1	Variables Platte	,015	1	,903
	Overall Statistics	,015	1	,903

Die Variable Genotyp wird einbezogen da sie einen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung des Merkmals hat die Variable Platte nicht.

Anhang 7: Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Anhang 8: Veröffentlichungen die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind

Franz S*, Ehlert B*, Liese A*, Kurth J, Cazalé A-C, Romeis T (2011) Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant 4: 83-96

*These authors contributed equally to this work.

Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid Signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. Sci Signal 4: ra32

Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KAS, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 8023-8028

Anhang 9: Poster, Präsentationen und Veröffentlichung

2008 Förderungsantrag bei der DFG der Forschergruppe 964: „Calcium signaling via protein phosphorylation in plant model cell types during environmental stress adaptation“, Münster.

Teilnahme

2009 Kolloquium der Forschergruppe 964, Münster

Vortrag: „Function and calcium-dependent regulation of CDPKs in abiotic stress response“.

22 Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Darbringhausen

Poster: „Funktion und calcium-abhängige Regulation von CPK21 und CPK23 aus Arabidopsis in der abiotischen Stressantwort“

Veröffentlichung:

Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, I. M, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 21425–21430

2010 Kolloquium der Forschergruppe 964, Heidelberg.

Teilnahme in Vertretung von Prof. Dr. Tina Romeis

Vortrag: „Function and calcium-dependent regulation of CDPKs in abiotic stress response“.

Tagung Plant Calcium Signaling 2010, Münster

Poster: „Regulation and function of Arabidopsis CDPKs in abiotic stress signal transduction“.

Havel-Spree Colloquium 2010, Berlin

Vortrag: „Regulation and function of Arabidopsis CPK21 and CPK23 in abiotic stress signal transduction“.

2011 Botaniker Tagung 2011, Berlin

Poster: „Regulation and function of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases (CDPKs) in abiotic stress signal transduction“.

2012 Kolloquium der Forschergruppe 964, München.

Vortrag: „Biochemical regulation, biological function and contribution to the calcium-regulated abiotic stress signalling network of CDPKs“