

CHARAKTERISIERUNG DER CDPKs CPK21 &
CPK23 AUS *ARABIDOPSIS THALIANA*

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

eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
vorgelegt von

SANDRA FRANZ

aus Halle (Saale)

08/2008

Die Untersuchungen zu vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2005 bis August 2008 an der Freien Universität Berlin, Abteilung Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von Prof. Dr. T. Romeis durchgeführt.

Erstgutachterin: Prof. Dr. Tina Romeis

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am:

04.11.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Fachbegriffe.....	I
Zusammenfassung.....	III
Summary.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Signaltransduktion in Pflanzen – Calcium.....	1
1.2 Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs).....	2
1.2.1 Proteinaufbau von CDPKs.....	3
1.2.2 Biochemische Aktivierung.....	4
1.2.2.1 Biochemische Aktivierung – Calciumbindung.....	4
1.2.2.2 Biochemische Aktivierung – Autophosphorylierung.....	5
1.2.3 Biologische Funktionen von CDPKs.....	6
1.3 Abiotischer Stress.....	8
1.3.1 Salzstress.....	8
1.3.2 Osmotischer Stress.....	11
1.3.3 ABA als Signalmolekül für abiotischen Stress.....	12
1.4 Zielstellung dieser Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Chemikalien und Oligonukleotide.....	14
2.1.2 Pflanzenmaterial.....	14
2.1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.1.4 Enzyme, Proteine, Antikörper.....	15
2.1.5 Nährmedien, Stämme, Plasmide.....	16
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.1 Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial mit der Trizol-Methode (nach Chomczynski und Sacchi, 1987).....	19
2.2.2 DNase I-Behandlung und Einzelstrang cDNA-Synthese.....	19
2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	20
2.2.4 Amplifizierung von DNA.....	20
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	21
2.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	21
2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmiden.....	21
2.2.8 Dephosphorylierung des restriktionsverdauten Vektors.....	22
2.2.9 Ligation.....	22
2.2.10 GATEWAY Klonierungen.....	22
2.2.11 Zielgerichtete Mutagenese.....	22
2.2.12 Plasmidkonstrukte.....	23
2.2.13 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.14 Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	24
2.2.15 Herstellung chemo-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	24
2.2.16 Herstellung elektro-kompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen.....	25
2.2.17 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> Zellen mit der Hitzeschockmethode.....	25
2.2.18 Transformation von Plasmid-DNA in <i>A. tumefaciens</i> Zellen mittels Elektroporation.....	25
2.2.19 Protoplastentransfektion.....	26
2.2.20 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen.....	27

2.2.21	Histochemische Färbung der Glucuronidase-Aktivität.....	27
2.2.22	Computergestützte Sequenzanalyse.....	27
2.3	Proteinchemische Methoden.....	27
2.3.1	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> Blättern.....	27
2.3.2	Proteinextraktion nach transienter Expression Strep II markierter Proteine in <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
2.3.3	Proteinextraktion StrepII markierter Proteine aus stabil transformierten <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen.....	28
2.3.4	Kinaseaktivitätsbestimmung.....	29
2.3.5	In Gel Kinase Test (nach Romeis et al., 2000).....	29
2.3.6	Proteinbestimmung (Bradford-Methode).....	30
2.3.7	Denaturierende SDS-PAGE.....	30
2.3.8	Western Blot.....	31
2.3.9	Immunodetektion von StrepII markierten Proteinen.....	31
2.3.10	Immunodetektion phosphorylierter MAP-Kinasen (TEY Western).....	32
2.3.11	Colloidal Coomassie Färbung.....	32
2.3.12	Silberfärbung von SDS-Gelen.....	32
2.4	Pflanzenanzucht.....	33
2.4.1	Pflanzenwachstumsbedingungen.....	33
2.4.2	Oberflächensterilisierung von Samen.....	33
2.4.3	Stabile <i>A. thaliana</i> Transformation.....	34
2.4.4	Selektion stabiler transgener <i>A. thaliana</i> auf Erde.....	34
2.4.5	Segregationsanalyse auf MS-Medium.....	34
2.4.6	Schüttelkultur.....	34
2.4.7	Keimungstests.....	35
2.4.8	Wachstumstests.....	35
2.4.9	Phänotypische Charakterisierung auf Erde gewachsener Pflanzen.....	35
2.4.10	Pflanzenanzucht und Probenaufarbeitung für Natrium- und Kaliummessungen mittels ICP-MS.....	36
2.4.11	Blatttrocknungstests.....	36
2.4.12	Fluoreszenzmikroskopie.....	36
2.4.13	Kreuzung von Arabidopsis-Linien.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Charakterisierung derT-DNA Insertionslinien <i>cpk21</i> (SALK_029412) und <i>cpk23</i> (SALK_007958).....	37
3.2	Phänotypische Charakterisierung von Col-0, <i>cpk21</i> (SALK_029412) und <i>cpk23</i> (SALK_007958).....	39
3.3	Phänotypische Analyse von Überexpressionslinien/ Komplementationslinien von <i>CPK21</i> in <i>cpk21</i> (SALK_029412) und <i>CPK23</i> in <i>cpk23</i> (SALK_007958) mit verschiedenen Enzymversionen.....	43
3.4	Transkriptionsanalyse nach Stressapplikation.....	47
3.5	Untersuchungen zur gewebsspezifischen Expression von <i>CPK21</i> und <i>CPK23</i>	51
3.6	Intrazelluläre Lokalisation von <i>CPK21</i> und <i>CPK23</i>	53
3.7	Bestimmung des Na ⁺ / K ⁺ -Gehalts in den grünen Geweben von Col-0, <i>cpk21</i> , <i>cpk23</i> und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9.....	55
3.8	Biochemische Charakterisierung von <i>CPK21</i>	56
3.8.1	Substratspezifität von <i>CPK21</i>	57
3.8.2	Biochemische Aktivität von <i>CPK21</i> -EF-Hand Varianten mit Syntide 2 als Substrat.....	58
3.8.3	Biochemische Aktivität von <i>CPK21</i> -EF-Hand Varianten mit Histon H1 als Substrat.....	60

3.8.4	Elektrophoretisches Lauf-Verhalten der EF-Hand Varianten nach Calciumbindung in der SDS-PAGE.....	61
3.8.5	Einfluss der Autophosphorylierung auf die biochemische Aktivität von CPK21	62
3.9	Biochemische Aktivität von CPK21 nach abiotischem Stress.....	63
3.9.1	<i>In vitro</i> Aktivität von CPK21 nach Salzstress.....	63
3.9.2	<i>In vivo</i> Aktivität von CPK21 nach Salz-Stressapplikation.....	64
3.9.3	<i>In vivo</i> Aktivität von CPK21 nach hyperosmotischem, hypoosmotischem Stress und mechanischem Stress	66
3.9.4	<i>In vivo</i> Aktivität von CPK21 nach ABA-Applikation	67
3.10	Crosstalk mit MPKs	67
4	Diskussion.....	69
4.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>cpk21</i> (SALK_029412) und <i>cpk23</i> (SALK_007958) T-DNA Insertionslinien	69
4.1.1	Phänotypische Charakterisierung adulter, auf Erde gewachsener Pflanzen	70
4.1.2	Langzeitstressadaption nach Wachstum auf 1 MS-Medium.....	71
4.1.3	Keimungstests	72
4.2	Expression von <i>CPK21</i> , <i>CPK23</i> und ausgewählter Stressmarkergene nach Salz- und hyperosmotischem Stress sowie ABA-Applikation.....	73
4.2.1	Untersuchung der Genexpression nach Zugabe von 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol bzw. 50 μ M ABA zu 2 Wochen alten Pflanzen	73
4.2.2	Untersuchung der Genexpression nach Langzeitstressadaption	74
4.3	Substratphosphorylierungsaktivität von CPK21 nach Stressapplikation.....	78
4.4	Crosstalk mit MAP Kinasen.....	79
4.5	CPK21 Enzymaktivität in Abhängigkeit der Calciumbindefähigkeit und Autophosphorylierung	80
4.5.1	Hinweise auf die Calciumbindeaffinitäten der C- und N-terminalen EF-Hände	80
4.5.2	Biochemische Aktivität der CPK21 EF-Hand Varianten.....	81
4.5.3	Einfluss der Autophosphorylierung auf die biochemische Aktivität von CPK21	83
4.6	<i>In vivo</i> Funktion der Enzymvarianten von CPK21 und CPK23.....	84
4.7	Putative Funktionen von CPK21 und CPK23 in der Salzstressantwort.....	85
4.7.1	Putative Funktionen von CPK21 und/oder CPK23 in der Regulation der Stomataöffnung.....	85
4.7.2	Putative Funktionen von CPK21 und CPK23 in der Regulation von Na ⁺ - und K ⁺ -Transportprozessen	89
4.8	Ausblick	96
5	Literatur.....	97
6	Anhang.....	108
7	Danksagung.....	116
8	Lebenslauf.....	117

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung
ABA	Abscisinsäure
ABRE	“ABA-responsive element”
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzen-sulfonyl- fluorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BCIP	Tetrazolium-5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl Phosphat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBL	Calcineurin B- ähnliche Proteine
CDPK/ CPK	Calcium-abhängige Protein Kinase
CDS	codierende Sequenz
cDNA	komplementäre DNA
CIPK	CBL-interagierende Proteinkinase
CLD	Calmodulin-ähnliche Domäne
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
COR	“cold regulated”
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DRE/CRT	“dehydration-responsive element/ C-repeat”
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ERD	“early responsive to dehydration”
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HRP	Meerrettich Peroxidase
kb	Kilobasen
kDa	Molekulargewicht, Kilodalton
KIN	“cold inducible”
LEA Proteine	“late-embryogenesis-abundant proteins”
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	„ <i>Multiple Cloning Site</i> “
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MS	Murashige & Skoog
Nt	<i>Nicotiana benthamiana</i>
N-Terminus	Amino-Terminus

OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RAB	“responsive to ABA”
RD	“responsive to dehydration”
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SAP	“shrimp alkaline phosphatase”
SOD	Superoxiddismutase
SOS	“salt overly sensitive”
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/HCl-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris-Borat-Natriumchlorid Puffer
TBST	TBS-Puffer + Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Temp.	Temperatur
T_m	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
ÜN	Übernacht-Kultur
X-Glc	X-Gluc 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
YFP	„ <i>Yellow Fluorescent Protein</i> ”

Zusammenfassung

Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) sind Ser/Thr Protein Kinasen, die stress-spezifische Änderungen cytoplasmatischer Calcium Konzentrationen erkennen und in definierte Phosphorylierungsmuster zur Signalweiterleitung übersetzten, worauf eine angemessene adaptive Antwort auf sich ständig verändernde Umweltbedingungen erfolgt.

In dieser Doktorarbeit wurde die Rolle der beiden nächsten verwandten CDPKs CPK21 und CPK23 aus *Arabidopsis thaliana* innerhalb der Signaltransduktion von Salz- und hyperosmotischem Stress untersucht. Mittels phänotypischer Charakterisierung adulter Pflanzen der beiden T-DNA-Insertionslinien *cpk21* (SALK_029412) und *cpk23* (SALK_007958) wurden CPK21 und CPK23 als putative Negativregulatoren der Salzstressantwort identifiziert, die insbesondere eine Rolle in der Antwort auf die osmotische Komponente des Salzstresses spielen.

Messungen des Natrium- und Kaliumgehaltes in den grünen Geweben von Col-0, *cpk21* und *cpk23* zeigten ein höheres K^+/Na^+ -Verhältnis in *cpk23* verglichen mit Col-0 nach eintägiger Exposition mit 100 mM NaCl.

Auf RT-PCR basierende Expressionsstudien zeigten, dass die Expression von *CPK21* als Antwort auf Salz- und hyperosmotischen Stress sowie ABA-Applikation aktiviert wird. *CPK23* Transkriptakkumulation wurde als Antwort auf hyperosmotischen Stress sowie ABA-Applikation beobachtet.

Auf eine Rolle von CPK21 in der Salzstressantwort weist auch die beobachtete biochemische *in vivo* Aktivierung des Enzyms nach Salz- und hyperosmotischem Stress, sowie nach ABA-Applikation hin.

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung von CPK21 wurde der Einfluss der Calciumbindung auf die Enzymaktivität untersucht. Dafür wurden verschiedene StrepII-markierte Versionen, in denen die Calciumbindung an eine (EF1, EF2, EF3 oder EF4) oder zwei EF-Hände (C-terminales oder N-terminales EF-Hand Paar) verhindert wurde, transient in *N. benthamiana* exprimiert. Nach Aufreinigung dieser Enzymvarianten und anschließendem Kinasetest mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen EF-Hände für die biochemische Aktivierung des Enzyms essentiell sind.

In vergleichenden physiologischen Studien unter Verwendung von Col-0, den beiden T-DNA Insertionslinien *cpk21* und *cpk23* sowie *cpk21* und *cpk23*, welche die generierten CPK21- und CPK23- Enzymvarianten unter Kontrolle des 35S-Promoters exprimierten, konnte gezeigt werden, dass die Enzymvarianten in Abhängigkeit ihrer *in vitro* Kinaseaktivität,

unterschiedliche Fähigkeiten besaßen, den Mutantenphänotyp zu komplementieren. Damit konnte zum ersten Mal eine Korrelation zwischen Ca^{2+} - abhängiger *in vitro* Kinaseaktivität und *in vivo* Funktion für CDPKs gezeigt werden.

Summary

Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) are Ser/Thr protein kinases which perceive changes in cytoplasmic calcium concentrations and translate them into defined phosphorylation patterns for signaltransduction in a continuously changing environment.

This PhD thesis addresses the role of the two closest homologs CPK21 and CPK23 from *Arabidopsis thaliana* in signaltransduction events upon salt - and hyperosmotic stress. Phenotypical characterisation of two T-DNA insertion lines *cpk21* (SALK_029412) and *cpk23* (SALK_007958) identified CPK21 and CPK23 as putative negative regulators in the salt stress response, with an unknown function in particular in response to the osmotic component of salt stress.

Measurements of the sodium- and potassium content in green tissues of Col-0, *cpk21* and *cpk23* showed a higher K^+/Na^+ -ratio in *cpk23* compared to Col-0 after one day exposure to 100 mM NaCl.

RT-PCR based expression studies showed an induction of *CPK21* expression after salt – and hyperosmotic stress and ABA application. *CPK23* transcript accumulation was observed in response to hyperosmotic stress and ABA application.

The biochemical *in vivo* activation of CPK21 after ABA application, salt – and hyperosmotic stress additionally refers to a role of the enzyme in salt signaltransduction.

For further biochemical characterisation of AtCPK21 the role of calcium binding for enzyme activity was investigated. Therefore different StrepII-tagged enzyme variants, with single mutations in all four EF-hands (EF1, EF2, EF3 oder EF4) and double mutations in either the C-terminal or N-terminal EF-hand pair, preventing calcium binding, were transiently expressed in *N. benthamiana*. After purification a kinase assay with different calcium concentrations was performed. It was shown that the N-terminal EF-hands were essential for biochemical activation of CPK21.

Physiological studies using Col-0, the two T-DNA insertion lines *cpk21* and *cpk23* and *cpk21* and *cpk23*, expressing the generated CPK21- and CPK23- enzyme variants under control of the 35S-promoter showed different abilities of the enzyme variants to complement the mutant phenotype dependent on their *in vitro* enzyme activity. This study showed for the first time a correlation between Ca^{2+} - dependent *in vitro* kinase activity and *in vivo* function for CDPKs.

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion in Pflanzen – Calcium

Um ihr Überleben und die Fortpflanzung unter sich ständig ändernden Lebensbedingungen zu sichern, müssen sich Pflanzen kontinuierlich den gegebenen Umständen anpassen. Dabei müssen unterschiedlichste abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Salz-, Wasserstress, sich verändernde Lichtbedingungen, mechanische Belastungen und biotische Stressfaktoren wie Pathogenbefall perzipiert werden. Geeignete pflanzliche Antworten auf diese Umweltsignale werden über multiple Stresserkennungs- und Signaltransduktionswege ausgelöst. Dabei können die unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden an mehreren Punkten überlappen, besitzen also die gleichen Komponenten oder führen zu gleichen Reaktionen. Second Messenger wie Ca^{2+} , cAMP, cGMP, H_2O_2 oder NO geben das empfangene Signal an Proteine weiter, die eine angemessene Antwort auslösen. Jedoch sind die meisten Stresssensoren sowie Signaltransduktionskomponenten noch nicht identifiziert.

Calcium stellt einen sehr wichtigen Second Messenger dar, um hormonelle -, Entwicklungs- und externe Signale weiterzuleiten (Reddy, 1993; Reddy, 2000; Trewavas und Malho, 1998). Calcium reguliert zelluläre Prozesse wie Cytoplasmaströmung, Gravitropismus, Zellverlängerung, -differenzierung, -teilung, -polarität, Photomorphogenese, Abwehrreaktionen und Stressantworten. (Hetherington und Brownlee, 2004; Reddy, 2000; Song et al., 2008; Zielinskie, 1998). Diese Signale verursachen einen kurzzeitigen Anstieg der cytosolischen niedrigen Calciumkonzentration (nicht stimuliert: 100-200 nM). Dabei wird angenommen, dass die Dauer, die Stärke und die zelluläre Lokalisation der Oszillationen der cytosolischen Calciumkonzentrationen für die spezifische Stressantwort der Zelle codieren (Sanders et al., 2002; Evans et al., 2001). Der Anstieg der Calciumkonzentration sowie die Länge und Frequenz der Calciumoszillation hängen spezifisch vom Stress, vorheriger Exposition mit dem spezifischen Stress sowie dem Gewebetyp ab (Chinnusamy et al., 2004). Veränderungen in der cytosolischen Calciumkonzentration werden von calciumbindenden Proteinen perzipiert. Aus Pflanzen kennt man 3 Klassen von calciumbindenden Proteinen, die Veränderungen der cytosolischen Calciumkonzentrationen in Protein-Phosphorylierungen übersetzen. Dabei handelt es sich um Calmodulin, das unter anderem auch mit Calmodulin abhängigen Kinasen interagiert, Calcineurin B- ähnliche (CBL) Proteine, die an CBL-interagierende Proteinkinasen (CIPK) binden und diese aktivieren beziehungsweise deaktivieren, sowie Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPK), welche als einzige Klasse Calcium-bindende - und Kinase-Aktivität in einem Molekül vereint.

1.2 Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs)

CDPKs sind Serin/ Threonin-Kinasen, die nur in Pflanzen und einigen Prokaryoten, wie dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* vorkommen. Sie bilden eine Genfamilie mit 34 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana*, und 29 Isoformen in *Oryza sativa*. Aufgrund von Sequenzidentitäten können die *Arabidopsis thaliana* CDPKs in einem phylogenetischen Baum dargestellt werden, der sich in vier Untergruppen einteilt (siehe Abbildung 1.1).

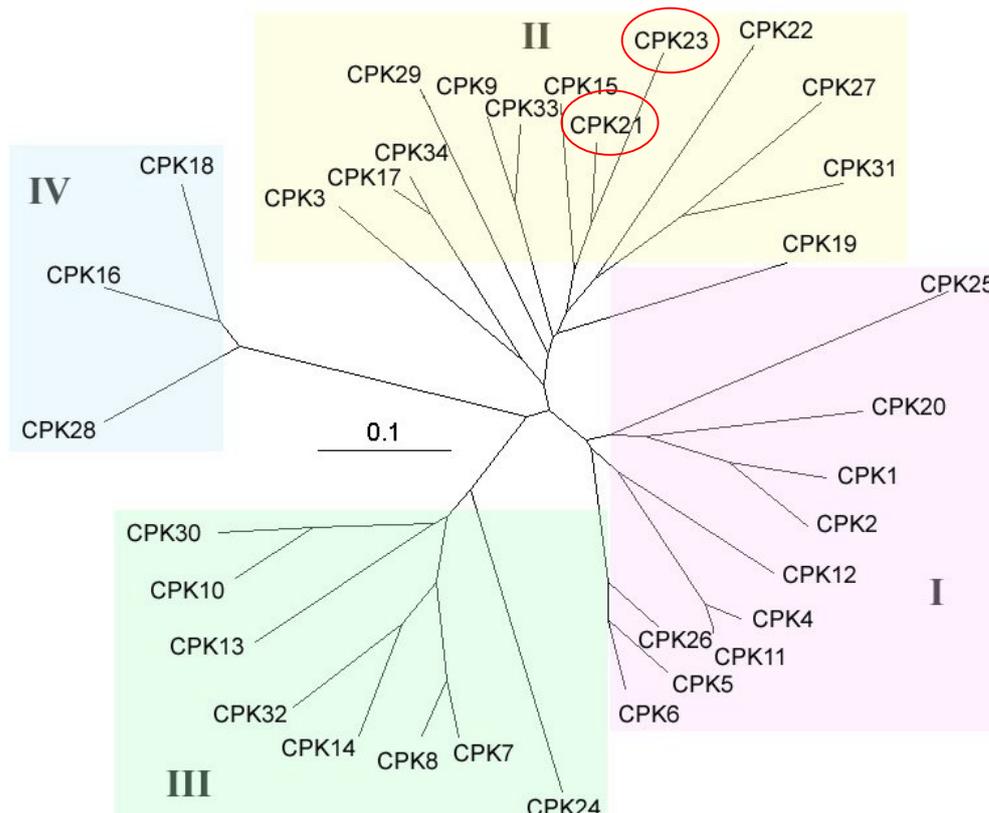


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der *A. thaliana* CDPK-Genfamilie, aus Cheng et al., 2002. Die Länge der Äste gibt den phylogenetischen Abstand der einzelnen CDPKs wieder. Die in dieser Arbeit untersuchten Genfamilienmitglieder *CPK21* und *CPK23* sind rot markiert.

Ob hohe Sequenzhomologie ähnliche biologische Funktion und Substratspezifität bedeutet, ist nicht bekannt. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass die am nächsten verwandten CDPKs aus *Arabidopsis* AtCPK4 und AtCPK11 die Abscisinsäure Signaltransduktion regulieren (Zhu et al., 2007). Andererseits regulieren die beiden in Schließzellen exprimierten AtCPK3 und AtCPK6 die Schließzellenappertur, obwohl sie nur 59 % Sequenzidentität auf Proteinebene besitzen und verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Mori et al., 2006).

1.2.1 Proteinaufbau von CDPKs

CDPKs besitzen eine hoch konservierte Struktur, die aus vier Domänen aufgebaut ist (Abbildung 1.2).

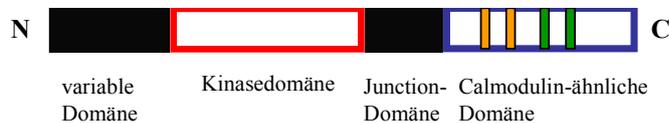


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CDPKs

Am N-Terminus befindet sich die variable Domäne, welche die größten Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen CDPKs aufweist und eventuell für Substratspezifität verantwortlich ist. CDPKs können am N-Terminus myristoyliert oder palmitoyliert vorliegen. Dabei handelt es sich um posttranslationale Modifikationen, die eine Membranbindung ermöglichen. 24 der 34 CDPKs aus *Arabidopsis thaliana* weisen eine Myristoylierungsstelle auf (Bucher und Bairoch, 1994).

C-terminal an die variable Domäne schließt sich die Kinase-Domäne an. Sie enthält das aktive Zentrum für die Proteinkinaseaktivität, sowie die ATP-Bindestelle. Darauf folgt die 31 Aminosäuren lange Junction-Domäne, deren C-terminaler Teil als Pseudosubstrat-Autoinhibitor fungiert. C-terminal lokalisiert befindet sich die Calmodulin-ähnliche Domäne, welche ungefähr 40 % Sequenzidentität mit Calmodulin aufweist (Chandran et al., 2005). Sie ist aus zwei strukturellen Einheiten, dem C- und N-terminalen Lobe mit jeweils 2 calciumbindenden EF-Händen zusammen gesetzt. Jede EF-Hand weist eine “helix-loop-helix” Struktur auf und bindet ein einzelnes Ca^{2+} -Ion. Die Calciumionenbindung findet in der 12 Aminosäuren langen Schleife statt, wobei das Calciumion über Sauerstoffatome mehrerer saurer Seitenketten sowie dem Carbonyl-Sauerstoffatom einer Peptidbindung komplexiert wird. Die Schleife weist folgendes Muster auf: $\text{X*Y*Z*}-\text{Y*}-\text{X**}-\text{Z}$, wobei die Aminosäuren X, Y und Z an der Calciumbindung beteiligt sind. Asn oder Asp werden meistens an Position X und Y gefunden, Asn, Asp oder Ser an Position Z, unterschiedliche Aminosäuren an Position –Y, an Position –X normalerweise Asp, Asn oder Ser und an Position –Z Glu (Nakayama et al., 2000).

1.2.2 Biochemische Aktivierung

Für die Aktivierung von CDPKs wurde ein Modell basierend auf biochemischen *in vitro* Daten entwickelt (Harmon et al., 1994; Harper et al., 1994; Huang et al., 1996; Yoo und Harmon, 1996; Vitart et al., 2000). Dieses Modell beschreibt einen Ruhe- und aktivierten Zustand des Enzyms. Im Ruhezustand bindet die Junction-Domäne als Autoinhibitor/Pseudosubstrat an das aktive Zentrum in der Kinase-Domäne und blockiert die Enzymaktivität. Stressinduzierte Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration führt zu Enzymaktivierung durch Autophosphorylierung und eine Konformationsänderung, die auf einer calciumabhängigen Interaktion der autoinhibitorischen Junctiondomäne mit der Calmodulin-ähnlichen Domäne beruht und die Junction-Domäne aus dem aktiven Zentrum entfernt.

1.2.2.1 Biochemische Aktivierung – Calciumbindung

Für 3 CDPKs aus Soja wurde eine 22-50 fache Stimulation der Enzymaktivität durch Calciumbindung gezeigt. Dabei weisen CDPK β und CDPK γ eine kooperative Calciumbindung auf. Die Calciumbindeaffinitäten der 3 CDPKs unterschieden sich um den Faktor 10 (Lee et al., 1998).

Die C- und N-terminalen EF-Hände sind jedoch nicht identisch in ihren Calcium- und Peptidbindeeeigenschaften. Die Messung der Calciumbindeaffinitäten der EF-Hände von AtCPK1 und LeCPK1 aus Arabidopsis und Tomate zeigte, dass sich die 4 Calcium-bindenden EF-Hand Motive in zwei Klassen von hoher und niederer Ca-Affinität aufspalten, wobei die C-terminalen EF-Hände eine signifikant höhere Calciumbindeaffinität aufwiesen, als die N-terminalen EF-Hände. (Christodoulou et al., 2004; Rutschmann et al., 2002). Während schon bei basalen cytosolischen Calciumionen-Konzentrationen Calcium konstitutiv an die C-terminalen EF-Hände gebunden ist, bindet es an die N-terminalen EF-Hände erst nach Calciumeinstrom in das Cytosol.

Des Weiteren wird basierend auf Röntgen-Kristall-Strukturstudien davon ausgegangen, dass die autoinhibitorische Junction-Domäne schon bei niedrigen Calciumionenkonzentrationen mit dem C-Lobe der Calmodulin-ähnlichen Domäne interagiert. Erst eine stressinduzierte cytosolische Calciumkonzentrationserhöhung führt zu der Interaktion des N-Lobes mit der Junction-Domäne, welche zu der aktivierenden Konformationsänderung führt (Chandran et al., 2005).

Diese Daten deuteten darauf hin, das C- und N-terminale EF-Hände unterschiedliche Funktionen bei der Aktivierung des Enzyms haben. Dabei scheint der N-Lobe als Calcium-Sensor-Domäne zu fungieren, deren Calciumbeladung das Enzym aktiviert (Chandran et al., 2005).

1.2.2.2 Biochemische Aktivierung – Autophosphorylierung

Calcium- und Mg-ATP abhängige Autophosphorylierung, die als Mobilitätsveränderung in der gelelektrophoretischen Auftrennung detektiert werden kann (Romeis et al., 2000 und 2001), wurde in fast allen untersuchten CDPKs festgestellt. Ausnahmen sind 2 CDPKs aus „winged bean“. WbCDPK zeigt eine calciumunabhängige Autophosphorylierung (Saha und Singh, 1995), während WbPK keinerlei Autophosphorylierungsaktivität aufweist (Ganguly und Singh, 1998). Es wird angenommen, dass Autophosphorylierung der funktionellen Regulation von CDPKs dient. Für NtCDPK2 konnte eine *in vivo* Aktivierung des Enzyms durch Autophosphorylierung gezeigt werden (Romeis et al., 2001). Die calciumabhängige Autophosphorylierung von GnCDPK aus Erdnuss erfolgt intramolekular und es wird vermutet, dass Autophosphorylierung eine Voraussetzung für Transphosphorylierungsaktivität des Enzyms ist (Chaudhuri et al., 1999). Im Gegensatz dazu wird WbCDPK Aktivität durch Autophosphorylierung inhibiert (Saha und Singh, 1995).

Hegeman et. al. (2006) identifizierten Autophosphorylierungsstellen in 8 CDPKs. In diesem Experiment konnten in keiner der untersuchten CDPKs Autophosphorylierungsstellen in der Junction-Domäne identifiziert werden. Konservierte Autophosphorylierungsstellen wurden aber in der variablen -, Kinase- und Calmodulin-ähnlichen Domäne gefunden. Es wurde von den Autoren vermutet, dass eine konservierte Stelle in EF-Hand 4 die Calciumbindung beeinflusst.

Eine physiologische Funktion für Autophosphorylierung konnte noch nicht festgestellt werden und auch die Reihenfolge oder wechselseitige Beeinflussung von Autophosphorylierung und Calciumbindung wurde noch nicht aufgeklärt.

1.2.3 Biologische Funktionen von CDPKs

Für viele CDPKs ist die biologische Funktion noch unbekannt. Jedoch weisen Transkriptionsdaten, *in vitro* Phosphorylierungsdaten und phänotypische Untersuchungen von CDPK Knock-Out-Pflanzen auf eine Funktion von CDPKs im Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus, Ionen- und Wassertransport, in der Cytoskelettorganisation, Phospholipidsynthese, Pathogenabwehr und abiotischer Stressantwort hin.

CDPK Transkriptanstieg wurde nach Kälte-, Salz-, und Trockenstress nachgewiesen (Berberich and Kusano, 1997; Urao et al., 1994; Tähtiharju et al., 1997; Martin und Busconi, 2001; Botella et al., 1996).

OsCDPK7 mRNA, jedoch nicht OsCDPK7 Protein aus Reis ist Kälte- und Salz-induzierbar und OsCDPK7 überexprimierende Pflanzen sind Kälte/ Salz- und Trockenstress-resistenter als Wildtyp-Pflanzen (Saijo et al., 2000). Gen- und Proteinexpression von OsCDPK13 wurden nach Kältestress induziert, jedoch nach Salz- und Trockenstress inhibiert. Des Weiteren wurde das Enzym nach Kälte beziehungsweise Gibberillinbehandlung phosphoryliert (Abbasi et al., 2004).

Transkript von AtCPK10 und AtCPK11 akkumuliert nach Salz- und Trockenstress, jedoch nicht nach Kälte- oder Hitzestress. Die Behandlung der Pflanzen mit ABA hatte keinerlei Effekt auf die Transkription der beiden Gene. Dies deutet darauf hin, dass beide Gene als Antwort auf eine Änderung des osmotischen Potentials aktiviert werden (Urao et al., 1994).

Die Expression der beiden CDPKs ZmCDPK1 und ZmCDPK7 aus Mais wird durch Kälte induziert (Berberich und Kusano, 1997). McCDPK1 aus *Mesembryanthemum crystallinum* wird durch Salz- und Trockenstress induziert (Patharkar und Cushman, 2000). Die Protein- und Genexpression von VfCPK1 aus Ackerbohne (*Vicia faba* L.) wurde durch Abscisinsäure und Trockenstress induziert, jedoch nicht durch NaCl, Kälte- oder Hitzestress (Liu et al., 2006).

Zhu et al. (2007) zeigten, dass ABA-Applikation die Proteinmenge von AtCPK4 und AtCPK11 erhöht und die Enzyme biochemisch aktiviert, während die Transkription der beiden Enzyme nicht beeinflusst wird. Des Weiteren wiesen die *cpk4* und *cpk11* Einzel- und Doppel-Genverlust-Pflanzen im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen eine ABA- und Salz insensitive Samenkeimung auf. Im Gegensatz dazu zeigten die *cpk4* und *cpk11* Einfach- und Doppel Genverlust-Pflanzen einen salzhypersensitiven Phänotyp im Keimlingswachstum nach Umsetzen auf NaCl haltiges Medium, 4 Tage nach der Keimung.

Eine 56 kDa CDPK aus Reis wurde nach Kältestressapplikation biochemisch aktiviert (Martin und Busconi, 2001). Eine weitere 41 kDa CDPK aus Reis wurde nach Kälte-, Salz- und Trockenstress biochemisch aktiviert (Li und Komatsu, 2000).

Eine Funktion in der Antwort auf Trocken- und Salzstress wurde auch für die in dieser Arbeit untersuchte AtCPK23 von Ma und Wu beschrieben. *Cpk23* Knock-Out- Pflanzen zeigten eine verstärkte Toleranz gegen Trocken-, osmotischen - und Salzstress. Des Weiteren wurde nach Salzstress ein größeres Kalium/ Natriumverhältnis im oberirdischen Gewebe der Knock-Out-Pflanze, verglichen zum Col-0 Wildtyp, festgestellt. Dies deutet auf eine veränderte Kaliumaufnahme hin (Ma und Wu, 1997).

Bisher ist wenig bekannt über Phosphorylierungssubstrate von CDPKs und die meisten Daten wurden *in vitro* gewonnen. Bei der Untersuchung von Phosphorylierungsaktivitäten *in vitro* zeigen CDPKs jedoch eine große Promiskuität, sodass diese Daten vorsichtig zu bewerten sind. 2006 wurde eine Interaktion von AtDi19 mit AtCPK11 in einem Yeast Two Hybrid Assay gezeigt. Im ebenfalls durchgeführten *in vitro* Kinase Assay wurde AtDi19 ebenfalls durch AtCPK11 phosphoryliert. (Rodriguez Milla et al., 2006). In einem Yeast two Hybrid Experiment wurde eine Interaktion von McCDPK1 mit CSP1 (CDPK substrate protein 1) nachgewiesen. Auch *in vitro* wurde CSP1 durch McCDPK1 phosphoryliert (Patharkar und Cushman, 2000). Weiterhin konnte ein synthetisches Peptid der 1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxylat-Synthase LeACS2 (ein Enzym aus der Ethylenbiosynthese) aus Tomate durch mehrere CDPKs u.a. LeCDPK2 (*in vitro*) phosphoryliert werden (Sebastia et al., 2004). AtCPK4 und AtCPK11, die die ABA Signaltransduktion in Schließzellen regulieren, konnten die ABA responsiven Transkriptionsfaktoren ABF1 und ABF4 *in vitro* phosphorylieren (Zhu et al., 2007).

Signaltransduktionsnetzwerke, an denen CDPKs beteiligt sind, sind noch ungenügend untersucht. Für NtCDPK2 konnte eine Verbindung mit MAPK- und Hormon Signalwegen gezeigt werden (Ludwig et al., 2005). Die Überexpression von OsCDPK7 aus Reis resultiert in Kälte und Salzstress resistenteren Pflanzen. Dabei wurden die (Wasserstress-responsiven) LEA Gene nach Salz-, jedoch nicht nach Kältestress aktiviert. Dies deutet darauf hin, das OsCDPK7 an der Signalkaskade für Salz- und Kältestress beteiligt ist, jedoch zwei unterschiedliche stressspezifische Signalwege aktiviert (Saijo et al., 2000).

1.3 Abiotischer Stress

Pflanzen sind neben biotischen Stressfaktoren wie Pathogenbefall unterschiedlichsten abiotischen Faktoren wie Hochsalz, Trockenheit oder extremen Temperaturen ausgesetzt. Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen jedoch sessile Organismen und müssen sich den gegebenen Umweltbedingungen anpassen. Da Pflanzen oft mehr als einen Stress gleichzeitig erfahren und diese in unterschiedlichen Entwicklungsstadien auftreten können, ist ein sehr komplexes System nötig, das Toleranz gegenüber allen Umweltfaktoren gewährleistet.

Einige abiotische Stressfaktoren üben - neben spezifischen - auch allgemeine Effekte auf Pflanzen aus. Trockenheit zum Beispiel limitiert das Pflanzenwachstum aufgrund reduzierter Photosynthese und geringerer Nährstoffzufuhr. Salzstress löst photooxidativen Stress aus, da es zu physiologischer Trockenheit führt (Zhu, 2002). Osmotischer Stress und der damit verbundene oxidative Stress ist eine Konsequenz von Trockenheit, hohen Salzkonzentrationen und Frost (Mahajan und Tuteja, 2005; Thomashow, 1999; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

1.3.1 Salzstress

Ungefähr 6 % agrarwirtschaftlich genutzter Flächen sind von hohen Salzkonzentrationen betroffen. Dies stellt auf Grund der reduzierten Ernteerträge ein großes Problem für die Landwirtschaft dar (Munns et al., 1999). Hohe Salzkonzentrationen üben mehrere Effekte auf Pflanzen aus. Es führt zu einem Wasserdefizit auf Grund des reduzierten Wasserpotentials, verursacht osmotischen Stress und die hohen Ionenkonzentrationen von vor allem Na^+ , Cl^- und SO_4^{2-} , haben eine cytotoxische Wirkung. Ein Überschuss an Na^+ und Cl^- im Cytoplasma stört die Photosynthese (Seemann und Critchley, 1985; Locy et al., 1996) und inhibiert die Proteinsynthese (Hurkman und Tanaka, 1987).

In der ersten Phase der Salzexposition (Minuten bis Stunden) wirkt vor allem der osmotische Effekt des Salzstresses auf die Pflanze und die Wasseraufnahme wird behindert. Nach Tagen und Wochen stört die cytotoxische Wirkung der aufgenommenen Ionen die Entwicklung der Pflanze. Na^+ und Cl^- lagern sich an Proteine und Enzyme an, wodurch diese inhibiert oder denaturiert werden. Des Weiteren konkurriert Na^+ mit K^+ in biochemischen Prozessen und Na^+ limitiert durch den direkten Einfluss auf Transporter und Kanäle in der Wurzel-Plasmamembran und indirekt durch Inhibierung des Wurzelwachstums auf Grund osmotischer Effekte die Aufnahme von Phosphor, Kalium, Nitrat und Calcium. All diese Prozesse stören das metabolische Gleichgewicht und verursachen oxidativen Stress durch die

vermehrte Produktion von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS). Dies führt zu einer Reduzierung der Zellexpansion, Assimilatproduktion, Membranfunktion und dem cytosolischen Metabolismus (Zhu, 2001 und 2002).

Die zelluläre Ionen-Homöostase und Hyperosmolarität werden über die zelluläre Aufnahme, Sequestrierung, Export und „Long-Distance“ Transport von Ionen reguliert. So soll die Aufnahme und der Transport von Na^+ -Ionen in die Blätter limitiert werden und überschüssige Ionen werden in der Vakuole sequestriert, um deren cytotoxische Effekte zu vermeiden und ein hohes cytosolisches K^+/Na^+ -Verhältnis zu erzielen. Dafür werden verschiedene ATPasen, Wasser-Kanal-Proteine und Ionen-Transporter transkriptionell und auf Proteinebene, zum Beispiel durch Phosphorylierung reguliert. In höheren Pflanzen werden Na^+ -Ionen durch Tonoplast - und Plasmamembran lokalisierte Na^+/H^+ -Antiporter aus dem Cytosol transportiert (Apse und Blumwald, 2007; Zhang et al., 2001; Blumwald et al., 2000). Die Transkription dieser Antiporter wird durch erhöhte cytosolische NaCl -Konzentrationen induziert. Die Überexpression der vakuolären Na^+/H^+ -Antiporter NHX1 (Apse et al., 1999) und AtAVP1 (Gaxiola et al., 2001) in Arabidopsis erhöhte deutlich die Salztoleranz. Das Salt-Overly-Sensitive (SOS) System mit den Komponenten SOS1, SOS2 und SOS3 erkennt einen Salzstress induzierten Calciumkonzentrationsanstieg (Zhu 2002). Dabei fungiert SOS3 (CBL4) als Calciumsensor, der das Calciumsignal an SOS2 (CIPK24), eine Serin/ Threonin-Proteinkinase, weiterleitet und diese aktiviert. SOS2 phosphoryliert den Na^+/H^+ -Antiporter SOS1, welcher Na^+ aus dem Cytosol in den Apoplast transportiert.

Natrium gelangt über den Transporter HKT1 (Rubio et al., 1995; Uozumi et al., 2000) und nichtselektive Kationen-Kanäle und -Transporter in die Zelle. Auf sehr salzhaltigen Böden konkurriert Na^+ mit K^+ um die Aufnahme. Vermehrte Na^+ -Aufnahme führt zu einem geringeren K^+/Na^+ -Verhältnis, was sich ungünstig auf biochemische Prozesse auswirkt. Versuche mit K^+ -Kanal überexprimierenden transgenen Melonen (HAL1) und *A. thaliana* (AtHAL3a) lassen vermuten, dass vermehrte Kalium-Akkumulation ein wichtiger Faktor für Salztoleranz darstellt (Bordas et al., 1997; Espinosa-Riuz et al., 1999).

Die durch Sequestrierung erzielten hohen Na^+ -Konzentrationen in der Vakuole erfordern ein Ausgleichen des cytosolischen osmotischen Potentials durch die Produktion von Osmolyten. Osmolyte sind nichttoxische Moleküle kleiner molekularer Masse, die nicht mit dem zellulären Metabolismus interagieren. Sie helfen den Turgordruck konstant zu halten, beeinflussen die Membranfluidität, detoxifizieren Reaktive Sauerstoffspezies und helfen die Hydrathülle um Proteine aufrecht zu erhalten (Hoekstra et al., 2001). Transgene Pflanzen, die

Osmolyte wie Mannitol (Karakas et al., 1997) oder Prolin (Hong et al., 2000) akkumulieren, zeigten eine erhöhte Salztoleranz.

Es wird angenommen, dass Ionenkanäle und –transporter Sensoren für Salzstress darstellen. Jedoch auch der Turgordruckverlust und die durch Na^+ -Einstrom verursachte Membrandepolarisation könnten als Signal für Salzstress dienen. Salzstresssignale werden durch Ca^+ und Rezeptor-Kinasen weitergeleitet, aber auch ABA und H_2O_2 spielen eine Rolle in der Salzsignaltransduktion. Salzstress löst innerhalb von 5-10 Sekunden Calciumoszillationen aus (Knight et al., 1997).

Bereits veröffentlichte Daten lassen vermuten, dass CDPKs an der Weiterleitung salzinduzierter Calciumsignale beteiligt sind. Transkript von AtCPK10 and AtCPK11 akkumuliert nach Salz- und Trockenstress, jedoch nicht nach Kälte- oder Hitzestress. Dies deutet darauf hin, dass beide Gene an der Signaltransduktion von osmotischem Stress beteiligt sind (Urao et al., 1994). OsCDPK7 überexprimierende Pflanzen sind Kälte/ Salz- und Trockenstress-resistenter (Saijo et al., 2000). Auch für die in dieser Arbeit untersuchte AtCPK23 wurde eine Funktion in der Antwort auf Trocken- und Salzstress gezeigt. *Cpk23* Genverlust- Pflanzen zeigten eine verstärkte Toleranz gegen Trocken-, osmotischen - und Salzstress. Dies lässt sich eventuell mit erhöhter Kaliumaufnahme erklären (Ma und Wu, 1997). Salzstress aktiviert neben CDPK Signalkaskaden auch andere Signaltransduktionswege, darunter MAPK-Kaskaden. Dabei stellen die MAPK-Signalwege den stärksten Beweis für „cross-talk“ zwischen verschiedenen abiotischen Stresssignalwegen dar. So werden AtMPK3, AtMPK4 und AtMPK6 durch Salzstress aktiviert, AtMPK4 aber auch durch Kälte, niedrige Luftfeuchtigkeit, osmotischen Stress und Verwundung (Mizoguchi et al., 1996; Ichimura et al., 2000). Auch eine putative MAPK Kinase Kinase wurde als Negativregulator der Salzstressantwort identifiziert (Gao und Xiang, 2008).

ABA spielt eine wichtige Rolle in der Adaption an Salzstress. ABA akkumuliert in Wurzel und Spross auf Grund von hohen Salzkonzentrationen ausgelöstem ionischen - und osmotischen Stress (Jia et al., 2002). ABA reguliert, ausgelöst durch Ca^+ -Oscillationen, den Wasserhaushalt durch Schließen der Stomata und Genregulation von Genen, die an der Osmolytbiosynthese beteiligt sind, beziehungsweise schützend wirken (LEA-like Gene, darunter RD - (responsive to dehydration), KIN - (cold inducible) und RAB - Gene (responsive to ABA)) (Hasegawa et al., 2000; Leung und Giraudat, 1998; Schroeder et al., 2001; Zhu, 2002).

1.3.2 Osmotischer Stress

Wasser ist mit 80 % bis 95 % Biomasseanteil in nicht verholzten Pflanzen das zentrale Molekül in allen physiologischen Prozessen. Es dient dem Transport von Metaboliten und Nährstoffen und der in Pflanzen durch Wasser erzeugte Turgordruck ist verantwortlich für das Zellwachstum. Der Wasserpotentialgradient über Plasmamembranen bestimmt den Fluss von Wasser, abhängig von der Konzentration gelöster Moleküle innerhalb und außerhalb der Zelle. Das Wasserpotential setzt sich hauptsächlich aus Druck und osmotischem Potential zusammen und ein positiver Turgordruck kann durch ständige Anpassung des osmotischen Potentials aufgebaut werden. Veränderungen im Wasserpotential durch Trockenheit, Hochsalz oder Frost lösen osmotischen Stress aus.

Wie schon in Absatz 1.3.1 beschrieben, reagieren Pflanzen auf osmotischen Stress metabolisch mit einem veränderten Kohlenstoffmetabolismus und der Synthese von Osmolyten wie Zuckern, Polyolen und Aminosäuren, zellulär durch eine veränderte Aufnahme, Transport und Sequestrierung von Ionen und morphologisch durch die Inhibierung des Sprosswachstums und Aktivierung des Wurzelwachstums. So sollen die zelluläre Ionen-Homöostase reguliert und Toxine detoxifiziert werden (Hasegawa et al., 2000).

Neben der Regulation des osmotischen Potentials haben Osmolyte auch eine Funktion im Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies und sie helfen die Konformation von Enzymen zu stabilisieren (Smirnov und Cumbes, 1989; Hong et al., 2000).

Hyperosmolarität verursacht des Weiteren oxidativen Stress durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; zum Beispiel: Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Superoxidradikale). Die Fähigkeit, ROS abzufangen und deren schädliche Wirkungen zu minimieren, stellt eine wichtige Eigenschaft von Stresstoleranz dar. Die Überexpression des Enzyms Superoxiddismutase (SOD), welches die Umwandlung von Superoxidanionen in Hydrogenperoxid und Wasser katalysiert, führt zu einer erhöhten Stresstoleranz gegenüber abiotischen Stressen wie tiefen Temperaturen und Trockenheit (Bohnert und Sheveleva, 1998).

Auch die Rezeptoren für osmotischen Stress sind noch nicht bekannt. Kandidaten für Ionenstressrezeptoren sind Ionentransporter, Ionenkanäle, die mechanische Veränderungen detektieren sowie Membranproteine, die Veränderungen im Turgordruck wahrnehmen können. Sekundäre Signalstoffe wie die Phytohormone ABA und Ethylen, reaktive Sauerstoff

Spezies (ROS) und Second Messenger wie Calcium und Phospholipide sind an der Signalweiterleitung beteiligt (Xiong und Zhu, 2002; Boudsocq und Lauriere, 2005).

1.3.3 ABA als Signalhormon für abiotischen Stress

Neben der Regulation von Entwicklungsprozessen wie Samenreife und Blattseneszenz nimmt Abscisinsäure (ABA) eine sehr wichtige Rolle für die Antwort auf unterschiedliche abiotische Stresse wie Trockenheit, Salz und Kälte ein.

Die ABA Verfügbarkeit wird unter Wasser- und osmotischem Stress entweder durch vermehrte Biosynthese oder Umverteilung gesteigert (Slovik et al., 1995; Zeevaart und Creelman, 1988). Erreicht die ABA Konzentration einen bestimmten Schwellenwert, werden Stress-assoziierte Reaktionen wie Schließen der Schließzellen durch Turgorregulation oder veränderte Genexpression ausgelöst, wobei die Genexpression von circa 14 % aller Arabidopsisgene durch ABA reguliert wird (Huang et al., 2007; Rock, 2000; Webb et al., 2001). Die ABA-Konzentration steigt jedoch relativ langsam, weswegen angenommen wird, dass ABA vor allem adaptive Prozesse reguliert.

So wird ABA eine Rolle in der Adaption an den vorherrschenden Wasserstatus zugeschrieben (Christmann et al., 2006). Salz-, Kälte- und Trockenstress werden hauptsächlich mit reduzierter Wasserverfügbarkeit assoziiert. Während Pflanzen diesen abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt sind, wird die Transkription vieler Markergene sowohl ABA-abhängig als auch –unabhängig reguliert.

Bisher wurden drei Proteine als ABA-Rezeptoren publiziert. Dies waren 2004 der putative G-Protein gekoppelte Rezeptor GCR1 (Pandey und Assmann, 2004), 2006 das RNA-Bindeprotein FCA (Razem et al., 2006) und die Mg-Chelatase Untereinheit H (Shen et al., 2006). Keines dieser drei Proteine konnte jedoch als ABA-Rezeptor bestätigt werden.

Ca²⁺ wurde neben anderen Molekülen als Second Messenger der ABA-abhängigen Signaltransduktion identifiziert. Calciumoszillationen verursachen das Schließen der Schließzellen (Schroeder et al., 2001). Die CDPKs AtCPK4 und AtCPK11 sowie AtCPK3 und AtCPK6 sind an der ABA Signaltransduktion sowie der Regulation Ca²⁺-permeabler Kanäle in Schließzellen beteiligt (Zhu et al., 2007; Mori et al., 2006).

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

CDPKs spielen eine Rolle in der Signaltransduktion einer Vielzahl verschiedenster abiotischer und biotischer Stressfaktoren. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der beiden am nächsten verwandten CDPK-Isoformen CPK21 und CPK23 aus *Arabidopsis thaliana* innerhalb der Signaltransduktion von abiotischem Stress untersucht werden. Dafür wurden phänotypische Untersuchungen sowie auf RT-PCR basierende Expressionsstudien nach Applikation der oben genannten abiotischen Stressfaktoren unter Verwendung von *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp, CPK21- und CPK23- T-DNA Insertionslinien sowie komplementierten CPK21 und CPK23 T-DNA-Linien durchgeführt.

Neben der Untersuchung der biologischen Funktion von CPK21 und CPK23 innerhalb der Signaltransduktion von Salz und osmotischem Stress wurde CPK21 biochemisch charakterisiert. Insbesondere wurde der Einfluss von (Auto-) Phosphorylierung und Calciumbindung des Enzyms nach Stressstimulus auf die Enzymaktivität untersucht. Dafür wurden verschiedene Versionen des Strep-markierten Enzyms transient in *N. benthamiana* exprimiert. Bei diesen Versionen handelt es sich um eine verkürzte Form ohne Autoinhibitor und C-terminaler Domäne, einer Mutante ohne Proteinkinase-Aktivität, sowie Mutationen in den EF-Händen, welche die Calciumbindung vermitteln.

Weiterhin wurde die Aktivierung von CPK21 nach Salz- und osmotischem Stress sowie nach ABA-Applikation *in planta* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Oligonukleotide

Alle verwendeten Laborchemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Bio-Rad (München), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Steinheim) verwendet. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien wurden von Duchefa (Niederlande) bezogen. Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und die entsprechenden PCR-Bedingungen sind im Anhang aufgeführt. Sequenzierungen wurden von Dr. Meixner GmbH an der Humboldt Universität Berlin durchgeführt.

2.1.2 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Col-0) und *Nicotiana benthamiana* verwendet. *Nicotiana benthamiana* diente der transienten Expression von Proteinen für die biochemische Charakterisierung der untersuchten *Arabidopsis thaliana* CDPKs.

2.1.3 *Arabidopsis thaliana*

In der vorgelegten Arbeit wurden eine Wildtyplinie (Ökotyp Col-0) und 4 T-DNA Insertionslinien im Col-0 Hintergrund verwendet. Als Wildtyp-Kontrolle diente in allen Versuchen die Linie Col-0. Die T-DNA Insertionslinien dienten als Hintergrund für die Komplementation mit unterschiedlichen Varianten von CPK21 und CPK23. Alle Linien werden im Nachfolgenden näher charakterisiert.

Ökotyp Abkürzung Originalquelle

Columbia	Col-0	J. Dangl, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
----------	-------	--

Gen Hintergrund Linie Mutagen Referenz/Quelle

cpk21	Col-0	SALK_029412	T-DNA	(Alonso et al., 2003)
cpk23	Col-0	SALK_007958	T-DNA	(Alonso et al., 2003)

Folgende *Arabidopsis thaliana* Linien wurden in dieser Arbeit generiert.

Konstrukt	Promoter	Hintergrund	Resistenz
pXCSG-StrepII CPK21	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 EF1	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 EF2	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 EF3	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 EF1/2	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 EF3/4	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 D204A	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK21 vk	35S	<i>cpk21</i>	PAT
pXCS-HA-StrepII CPK21	p _{CPK21}	<i>cpk21</i>	PAT
pXCS-HA-StrepII CPK21 D204A	p _{CPK21}	<i>cpk21</i>	PAT
pXCSG-YFP CPK21	35S	Col-0	PAT
pXCS-YFP CPK21	p _{CPK21}	Col-0	PAT
pXCS-GUS	p _{CPK21}	Col-0	PAT
pXCSG-StrepII CPK23	35S	<i>cpk23</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK23 EF1	35S	<i>cpk23</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK23 EF3	35S	<i>cpk23</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK23 EF4	35S	<i>cpk23</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK23 EF1/2	35S	<i>cpk23</i>	PAT
pXCSG-StrepII CPK23 EF3/4	35S	<i>cpk23</i>	PAT
pXCS-YFP CPK23	p _{CPK23}	Col-0	PAT
pXCS-GUS	p _{CPK23}	Col-0	PAT

2.1.4 Enzyme, Proteine, Antikörper

Tab.2: Verwendete Enzyme, Proteine, Antikörper und Marker.

Name	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase („shrimp“)	Roche (Penzberg)
DNA-Größenmarker Hyperladder I	Bioline (Luckenwalde)
Gateway TM LR Clonase II TM Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Protein-Größenmarker SeeBlue TM Plus2, Pre-Stained	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuTurbo® DNA Polymerase	Roboklon (Berlin)
Restriktions-Endonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt)

Strep-Tactin®, AP-Konjugat	IBA (Göttingen)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase, rekombinant	Renate (Romeis Labor, Berlin)

2.1.5 Nährmedien, Stämme, Plasmide

Tabelle 2.1 Medien

Medium	Zusammensetzung
LB	1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, mit 1M NaOH auf pH 7,0, in H ₂ O Nach dem Autoklavieren Zugabe von Antibiotika
YEB	0,5% (w/v) Fleisch-Extrakt, 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) Pepton 0,5% (w/v) Saccharose, 2 mM MgSO ₄ , mit 1M NaOH auf pH 7,2, in H ₂ O Nach dem Autoklavieren Zugabe von Antibiotika.
CR	2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) MgSO ₄ 0,074 % (w/v) KCl (10 mM), in H ₂ O, autoklavieren
MS	Makroelemente: 20,6 mM NH ₄ NO ₃ , 18,7 mM KNO ₃ , 3 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O, 1,5 mM MgSO ₄ * 2 H ₂ O, 1,25 mM KH ₂ PO ₄ Mikroelemente: 130 µM MnSO ₄ * H ₂ O, 100 µM H ₃ BO ₃ , 30 µM ZnSO ₄ * 7 H ₂ O, 1 µM Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O, 12,5 µM KI, 0,1 µM CuSO ₄ * 5 H ₂ O, 0,1 µM CoCl ₂ * 6 H ₂ O Eisensulfat: 100 µM FeSO ₄ * 7 H ₂ O, 100 µM Na ₂ EDTA 0,05 % (w/v) MES-Puffer auf pH 5,7 einstellen Festmedium (Zugabe von 0,8 % Phytoagar (Duchefa, Niederlande))

Tabelle 2.2 Stämme

Escherichia coli

Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurden die Stämme DH5α und Mach1TM (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, mit Ausnahme der Kultivierung von Gateway[®]-Expressionsvektoren ohne Insert. Hierfür wurde der Stamm DB3.1TM (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt.

Bezeichnung	Merkmale	Referenz
DH5∇	SupE44, lacZΔM15, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Hanahan, 1983
Mach1 TM	F' φ80(lacZ)ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(rk-, mk+), ΔrecA1398 endA1 tonA	

DB3.1TM	F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr , hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1, proA2 rpsL20(SmrR) xyl5 λ - leu mtl1
---------	---

Agrobacterium tumefaciens

Der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 wurde für die stabile Transformation von *A. thaliana* und für die transiente Expression in *N. benthamiana* verwendet. Der Stamm trägt das Helferplasmid pmp90RK (Koncz und Schell, 1986) und er besitzt Resistenzgene für Kanamycin, Rifampicin und Gentamycin.

Bezeichnung	Merkmale	Referenz
GV3101::pMP90RK	T-DNA-, RifR, GmR, KanR	Koncz und Schell, 1986
C58C1::pCH32	C58C1, RifR, GmR (zur Expression des p19 silencing Inhibitors aus dem Vektor 35S::p19)	Voinnet et al., 2003

Tabelle 2. 3 Vektoren, Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Beschreibung
pCR®-Blunt II- TOPO®	Kanamycin	Topo®-Vektor, zum Klonieren von PCR-Produkten ohne A-Überhang (Invitrogen, Karlsruhe.)
pENTR™ /D-TOPO®	Kanamycin	ENTRY-Vektor für GATEWAY Klonierungen in Expressionsvektoren.
pXCSG-StrepII	Ampicillin	Binärer Gateway®-Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminalen StrepII-Epitop-tag unter Kontrolle des Blumenkohl Mosaik Virus (CMV)-Promotors 35S. (Witte et al., 2004).
pXCS-HA-StrepII	Ampicillin	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminalen Hämagglutinin (HA)- und StrepII-Epitop-tag; (hergestellt von C.-P. Witte, FU Berlin)
pXCS-GUS	Ampicillin	Binärer Expressionsvektor, der das E. coli uidA-Gen (GUS) trägt
pXCS-YFP	Ampicillin	Binärer Expressionsvektor, der das yellow fluorescent Protein trägt
p35S:p19	Kanamycin	

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide**Plasmide zur Komplementation von *cpk21* bzw. *cpk23* T-DNA Insertionslinien**

Bezeichnung	Beschreibung
pXCSG-StrepII CPK21 pXCSG-StrepII CPK21 EF1 pXCSG-StrepII CPK21 EF2 pXCSG-StrepII CPK21 EF3 pXCSG-StrepII CPK21 EF4 pXCSG-StrepII CPK21 EF1/2 pXCSG-StrepII CPK21 EF3/4 pXCSG-StrepII CPK21 D204A pXCSG-StrepII CPK21 vk	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor für CPK21 CDS (einschließlich mutagenisierte Versionen EF1, EF2, EF3, EF4, EF1/2, EF3/4, D204A, vk) mit C-terminalen StrepII-Epitop-tag unter Kontrolle des 35S Promoters.
pXCS-HA-StrepII CPK21 pXCS-HA-StrepII CPK21 D204A pXCS-HA-StrepII CPK21 vk	Expressionsvektor für die genomische Version von CPK21 (einschließlich der Versionen D204A, vk) mit C-terminalen Hämagglutinin (HA)- und StrepII-Epitop-tag; unter Kontrolle des nativen <i>cpk21</i> Promoters.
pXCSG-StrepII CPK23 pXCSG-StrepII CPK23 EF1 pXCSG-StrepII CPK23 EF2 pXCSG-StrepII CPK23 EF3 pXCSG-StrepII CPK23 EF4 pXCSG-StrepII CPK23 EF1/2 pXCSG-StrepII CPK23 EF3/4	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor für CPK23 CDS (einschließlich mutagenisierte Versionen EF1, EF2, EF3, EF4, EF1/2, EF3/4, D193A, vk) mit C-terminalen StrepII-Epitop-tag unter Kontrolle des 35S Promoters.

Plasmide zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression sowie intrazellulärer Lokalisation von CPK21 bzw. CPK23

Bezeichnung	Beschreibung
pXCSG-YFP CPK21	Binärer Gateway [®] - Expressionsvektor für CPK21 CDS–YFP Fusions-Protein unter Kontrolle des 35S Promoters.
pXCS-YFP CPK21	Expressionsvektor für CPK21 CDS –YFP Fusions-Protein unter Kontrolle des nativen <i>cpk21</i> Promoters.
pXCS-GUS CPK21	Binärer Expressionsvektor für das E. coli uidA-Gen (GUS) unter Kontrolle des nativen <i>cpk21</i> Promoters.
pXCS-YFP CPK23	Expressionsvektor für CPK23 CDS –YFP Fusions-Protein unter Kontrolle des nativen <i>cpk23</i> Promoters.
pXCS-GUS CPK23	Binärer Expressionsvektor für das E. coli uidA-Gen (GUS) unter Kontrolle des nativen <i>cpk23</i> Promoters.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial mit der Trizol-Methode (nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Bei der RNA-Isolation muss darauf geachtet werden, immer frische RNase freie Materialien und Lösungen zu verwenden.

Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser pulverisiert und davon circa 0,1 g in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 1 ml Trizol (0,8M Guanidin Thiocyanat; 0,4 M Ammonium Thiocyanat; 0,1 M Natrium Acetat; 5 % Glycerin; 38 % Phenol) versetzt, um die pflanzlichen Proteine und genomische DNA von der RNA zu trennen. Nach anschließendem einminütigen Schütteln, 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneuter einminütiger Durchmischung wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und 20 Sekunden erneut gut durchmischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 15 Minuten bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dadurch erfolgte eine Phasentrennung in eine organische Phase unten und eine wässrige Phase oben. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfggefäß überführt. Es erfolgte eine RNA-Fällung mit 0,5 ml Isopropanol. Nach Durchmischung der Phasen und Zentrifugation für 10 Minuten bei 15000 x g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 15000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20µl Wasser aufgenommen. Um den Lösungsvorgang zu beschleunigen, wurde das Eppendorfggefäß für 5 Minuten bei 50°C inkubiert. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration, wurde eine 1:200 Verdünnung in Wasser vorgenommen und die Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten am Spektrophotometer bestimmt, wobei 40 µg/ml RNA einer OD von 1 entsprechen. Anschließend wurden 1 µg RNA auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, um die Qualität der Präparation zu überprüfen.

2.2.2 DNase I-Behandlung und Einzelstrang cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von PolyA⁺-RNA erfolgte mit der MMLV Reversen Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die Inkubationsschritte bei verschiedenen Temperaturen erfolgten im „DNA Engine PTC-200“-„Thermocycler“ (MJ Research, USA). Es wurde 1µg RNA pro Synthese eingesetzt, welche vorerst mit Dnase I behandelt wurde.

1 µg RNA wurde mit 0,9 µl 10 x DNase Puffer, tridestilliertem Wasser und 1 U DNase I auf ein Volumen von 9 µl gebracht, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C gestoppt.

Für die cDNA-Synthese wurden auf die 10 µl DNase I behandelte RNA-Lösung 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5µg/µl) gegeben und 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach anschließender Abkühlung auf Eis für mindestens eine Minute wurden 4 µl MMLV Reaktionspuffer, 2 µl DDT (100mM) und 1 µl RNase OUTTM Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben. Nach anschließender Inkubation bei 37 °C für 2 Minuten wurde 1 µl (50 Units) MMLV Reverse TranscriptaseTM, gemischt und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Beendigung der Reaktion 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA konnte sofort für die PCR verwendet werden.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde die Edwards Methode gewählt (Edwards et al., 1991). Ein Blatt einer drei Wochen alten Pflanze wurde in 200 µl Edwardspuffer (200 mM Tris HCl ph 7,5; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA) und mit Hilfe von 4-8 Stahlkügelchen in einer Retschmühle zerkleinert. Zügig wurden danach 10 µl 10 % SDS-Lösung zugegeben und 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in frisches Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 75 µl Isopropanol gefällt. Anschließend wurde für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g und vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet vollständig getrocknet und anschließend in 100 µl tridestilliertem Wasser aufgenommen. 1 µl DNA wurden in einem 20 µl PCR Ansatz eingesetzt.

2.2.4 Amplifizierung von DNA

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus pflanzlicher cDNA beziehungsweise genomischer DNA unter Verwendung der hitzestabilen Polymerasen Taq oder Pfu wurde standardmäßig die Polymerasekettenreaktion (PCR) im „DNA Engine PTC-200“-Thermocycler (MJ Research, USA) verwendet. Dafür wurden zu den 3'-und 5'-Enden des zu amplifizierenden Fragmentes komplementäre Oligonukleotide (Primer) von 24 – 27 Basenpaarlänge designt. Zu dem Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten in der angegebenen Endkonzentration zugegeben, wobei die Reaktion in einem 20µl Ansatz

erfolgte: forward/ reverse Primer je 0,25 μM ; dNTP's 1 mM; Polymerase 10 fach Puffer 2 μl ; 0,5 μl Polymerase (Taq: 2,5 U; Pfu: 1,25 U); cDNA: 1 μl (entspricht 50 ng mRNA)

Nach einer Denaturierungsphase (95 °C) von 3 Minuten folgte für jedes Primerpaar eine spezifische Anzahl von Zyklen (siehe Anhang). Ein Zyklus setzte sich aus einer Denaturierungsphase (95 °C, 30 sec), einer Hybridisierungsphase (Temp. siehe Anhang, 30 sec) und einer Polymerisationsphase (72 °C, 30 s - 240 s) zusammen. Anschließend wurde die Polymerisation bei 72 °C für 7 Minuten fortgesetzt und die Reaktion auf 16 °C gekühlt.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die gelelektrophoretische Auftrennung von linearen DNA-Molekülen erfolgte in 1,0 % - 2,0 % (w/v) Agarosegelen (+50 ng/ml Ethidiumbromid). Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE (40 mM Tris, 0,1 mM EDTA mit 28,55 % (v/v) Eisessig auf pH 8,5 in H₂O) verwendet. Die DNA wurde mit 0,2 Vol. 5 x DNA-Ladepuffer (50 % (v/v) Glycerin ; 1 mM EDTA; 0,4 % (w/v) Bromphenol Blau) gemischt und aufgetragen. Als Größenstandard diente der Hyperladder I TM (Bioline, Luckenwalde). Die angelegte Spannung lag je nach Elektrophoresekammer zwischen 80 V und 160 V. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

2.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Nach Auftrennung der DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe wurde das Agarosestück, welches das interessierende DNA Stück enthält, ausgeschnitten, in dem entsprechenden Puffer bei 50 °C gelöst und auf einer Silikamembran gebunden, um sie von Verunreinigungen zu trennen. Die Eluierung der DNA von der Membran erfolgte mit 50 μl tridestilliertem Wasser.

2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmiden

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firma New England Biolabs (Frankfurt) nach Herstellerangaben verwendet. Unter Verwendung mehrerer Enzyme in einem Reaktionsansatz wurde der Puffer gewählt, bei dem die Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne

unspezifische Aktivitäten aufzuweisen. Standardmäßig wurden 300 µg Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz für eine Stunde bei 37 °C mit 0,2 µl Restriktionsenzym verdaut. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 Minuten bei 65 °C.

2.2.8 Dephosphorylierung des restriktionsverdauten Vektors

Um die Selbstligation von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurden die 5'-Enden durch Shrimp-alkaline-phosphatase (SAP) 30 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert und das Enzym anschließend 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Dafür wurde 2 µl SAP und die entsprechende Menge 10 x SAP-Reaktionspuffer zum gel-aufgereinigten Vektor gegeben.

2.2.9 Ligation

Die Ligation von Vektor und amplifiziertem Fragment erfolgte in 10 µl Ansätzen, bestehend aus folgenden Komponenten: 2 µl 5 x Ligase Puffer, 3 µl Vektor, 1 µl (1 U) T4 Ligase (Invitrogen) und 4 µl gereinigtes Insert. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.2.10 GATEWAY Klonierungen

Zur Klonierung von Genen aus dem „ENTRY“-Vektor pENTR/D-TOPO[®] in unterschiedliche binäre Expressionsvektoren wurde das Gateway[™]-System von Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde das gewünschte Konstrukt, inklusive „CACC“-Sequenz vor dem Start-Codon, mittels PCR amplifiziert und in den „ENTRY“-Vektor pENTR/D-TOPO[®] in gezielter Orientierung ligiert. Die Übertragung des Inserts in den „Destination“-Vektor erfolgte über eine „LR-Reaktion“ nach Angaben des Herstellers (LR-Clonase II Kit, Invitrogen, Karlsruhe). Nach Transformation der Reaktion in *E. coli* MACH1[™] (Invitrogen, Karlsruhe) oder DH5α Zellen konnten nur transformierte Zellen überleben, die ein Plasmid trugen, welches das Insert des „ENTRY“-Vektors enthielt.

2.2.11 Zielgerichtete Mutagenese

Die gezielte Einführung von Punkt-Mutationen wurde analog zum QuickChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt. Dabei wurden Primer gewählt, die direkt auf der zu mutagenisierenden Sequenz gebunden haben und die in einer PCR das

gesamte Plasmid amplifizierten. Als Elongationsdauer wurden 1 min je 1 kb Länge des Plasmids gewählt.

Reaktions-Ansatz (50 μ l):

5 μ l 10x Pfu-Puffer

240 μ l dNTPs (10 mM)

je 1,25 μ l Primer (10 mM)

1 μ l *PfuTurbo*[®]-Polymerase (2,5 U/ μ l)

10 ng Plasmid-DNA

mit H₂O auf 50 μ l

1 min, 94 °C anfänglicher Denaturierungs-Schritt

25 s, 94 °C Denaturierung

18 x 1 min, 50 °C Anlagerung der Primer

1 min je 1 kb, 68 °C Elongation

Für die Generierung von Doppel EF-Hand-Mutationen wurde mit den Primern EF1f und EF2r bzw. EF3f und EF4r ein DNA Fragment amplifiziert, welches in einer nachfolgenden PCR als Primer zur Amplifizierung des gesamten Plasmides diente.

Die DNA wurde anschließend mit 10 U des Restriktions-Enzyms DpnI, welches nur methylierte DNA erkennt und schneidet, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurde nur die, durch *E.coli* methylierte Ausgangs-DNA von DpnI erkannt und geschnitten. 3 μ l des DpnI behandelten PCR Ansatzes wurde in *E. coli* Zellen transformiert.

2.2.12 Plasmidkonstrukte

Im Folgenden wird kurz auf die Generierung der unterschiedlichen Expressions-Plasmide eingegangen.

Die Nomenklatur der binären Agrobakterien-Plasmide basierend auf dem Vektor pAMPAT-MCS („*accession number*“ AY436765) war wie folgt: Allgemeine Bezeichnung pX, gefolgt von C oder N (C- oder N-terminale Fusion des Epitoptags bzw. Fusionsproteins), S oder A (35S- bzw. pAlcA-Promotor), G (GatewayTM-kompatibel). Nach einem Bindestrich folgt die Bezeichnung des Epitoptags bzw. Fusionsproteins und nach anschließendem Leerzeichen der klonierte ORF (nach Witte et al., 2004).

Die genomische Sequenz von AtCPK21 wurde über die Schnittstellen EcoRI am 5'-Ende und XmaI am 3'-Ende in die Vektoren pXCS-HA-StrepII und pXCS-YFP ligiert.

Ein ca. 1200 bp Fragment des Promotors von AtCPK21 und AtCPK23 wurde über die Schnittstellen AscI am 5'-Ende und EcoRI am 3'-Ende in die Vektoren pXCS-HA-StrepII, pXCS-YFP und pXCS-GUS ligiert.

Die CDS von AtCPK21 und AtCPK23 wurde mittels LR Reaktion aus dem pENTR/ D-TOPO Vektor[®] in die GATEWAY Expressionsvektoren in pXCSG-StrepII und pXCSG-YFP kloniert.

2.2.13 Kultivierung von *Escherichia coli*

Über-Nacht-Kulturen (ÜNs) von *E. coli* wurden in autoklaviertem LB-Medium bei 37 °C angezogen. Dem Medium wurden, wenn nötig, folgende Antibiotika zugesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml. Zur Kultivierung auf Festmedium wurde LB-Agar verwendet, wenn nötig mit Antibiotika. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ÜNs mit 50 % Glycerin im Verhältnis 2:1 gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.14 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Kulturen von *A. tumefaciens* wurden in YEB-Flüssigmedium dicht angeimpft und 16 h bei 28 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Kultivierung auf Festmedium wurde YEB-Agar verwendet. Folgende Antibiotika wurden entsprechend der Stämme und Plasmide zugegeben: Carbenicillin 50-75 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Gentamycin 15 µg/ml, Rifampicin 100 µg/ml. Für Dauerkulturen wurden ÜNs mit 50 % Glycerin im Verhältnis 2:1 gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.15 Herstellung chemo-kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemo-kompetenter *E. coli* wurden 5 ml einer Übernachtskultur auf 200 ml CR-Medium (2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) MgSO₄ 0,074 % (w/v) KCl (10 mM), in H₂O) überimpft und in einem Erlenmeyer-Kolben bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls auf Eis und im Kühlraum. Die verwendeten Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. Das Zellsediment wurde in 60 ml Transformations-Puffer I (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, mit

verdünnter Essigsäure auf pH 5,8; sterilfiltriert, in H₂O) vorsichtig resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 8 ml Transformations-Puffer II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, mit 1 M NaOH auf pH 6,5; sterilfiltriert, in H₂O) aufgenommen und in Reaktionsgefäßen auf 200 µl aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.16 Herstellung elektro-kompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Zwei 5 ml ÜNs in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden auf 200 ml LB ohne Antibiotikum überimpft. Die Kulturen wurden bei 28°C und 180 rpm inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht haben. Anschließend wurden sie 5 min auf Eis gekühlt und bei 3500 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls auf Eis und im Kühlraum. Die verwendeten Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 ml und nach weiterer Zentrifugation in 100 ml tridestilliertem H₂O (4 °C) vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 16 ml 10 %-igem Glycerin (4 °C) gewaschen und wiederum in 16 ml 10 %-igem Glycerin (4 °C) vorsichtig resuspendiert. Aliquots von 40 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.17 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen mit der Hitzeschockmethode

Zur Transformation von Plasmid-DNA und DNA aus Ligations-Ansätzen in *E. coli* wurden 50 µl, auf Eis aufgetaute, chemo-kompetente *E. coli* mit 3 µl DNA-Lösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern konnte. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einem Wasserbad bei 42 °C für 45 s inkubiert. Die Zellen wurden 2 min auf Eis gekühlt und in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen und für 60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 5.000 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Das Zellpellet wurde resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.18 Transformation von Plasmid-DNA in *A. tumefaciens* Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation von Agrobakterien wurden 40 µl, auf Eis aufgetaute, elektro-kompetente Zellen mit 2 µl Plasmid-DNA (100-250 ng/µl) gemischt und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporations-Küvette gegeben und im Elektroporator

(Fa. Biorad) elektroporiert. Es wurde sofort 0,5 ml YEB-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß für 1 h bei 28 °C und 800 rpm im Eppendorf-Schüttler inkubiert. 50 µl wurden auf YEB-Agar mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2-4 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.19 Protoplastentransfektion

Die Protoplastentransfektion erfolgte nach Yoo et al., 2007. Bei allen folgenden Schritten wurde sehr vorsichtig und mit abgeschnittenen Pipettenspitzen gearbeitet.

Je drei Blätter von sechs vier Wochen alten *Arabidopsis thaliana* wurden mit einer frischen Rasierklinge in dünne Streifen geschnitten und in 5 ml Enzymlösung gegeben. Nach 30 minütiger Vakuuminfiltration wurde die Lösung 3 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml W5 Lösung und Filtration durch einen Nylonfilter mit 80 µm Porengröße (Neolab, Heidelberg) wurden die Protoplasten durch Zentrifugation bei 70 x g für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml W5 Lösung resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 70 x g für 5 Minuten wurde die Zelldichte auf 2×10^5 /ml in MMG eingestellt.

Für die Transfektion wurden auf 20 µg Plasmid-DNA (aber höchstens 20 µl) 100 µl Protoplastenlösung und 110 µl PEG Lösung gegeben und nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 440 µl W5-Lösung gestoppt. Nach anschließender Zentrifugation bei 100 x g für 2 Minuten wurden die Protoplasten in 1 ml WI-Lösung aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur in vorher mit 1 ml Kalbserum ausgespülten kleinen Petrischalen inkubiert.

Enzymlösung: 20 mM MES pH 5.7; 0,4 M Mannitol; 20 mM KCl; 1,5% Cellulase; 0,4% Macerozyme -> 10 min bei 55 °C inkubieren, dann auf 25 °C abkühlen lassen und 10 mM CaCl₂ und 0,1 % BSA zugeben

W5 Lösung: 2 mM MES, pH 5.7; 154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl

MMG: 4 mM MES, pH 5.7; 0.4 M Mannitol; 15 mM MgCl₂

PEG-Lösung: 40 % PEG in 0,2 M Mannitol; 100 mM CaCl₂

WI-Lösung: 4 mM MES, pH 5.7; 0.5 M Mannitol ; 20 mM KCl

2.2.20 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte mit dem illustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben. Die Plasmid DNA wurde mit 100 µl tridestilliertem Wasser von der Säulenmatrix eluiert.

Plasmid-DNA für die Protoplastentransfektion wurde mit dem Plasmid Midi Kit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert und nach der DNA-Fällung in 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.21 Histochemische Färbung der Glucuronidase-Aktivität

Für die Expressionsanalyse mittels GUS-Färbung wurde das Pflanzenmaterial in passenden Reaktionsgefäßen mit GUS Lösung (1 mg/ml X-Glc) überschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden in einem Exsikator dreimal für jeweils 1 Minute unter Vakuum gesetzt. Die Gefäße wurden verschlossen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend in 70 % Ethanol entfärbt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Pflanzenteile in 70 % Ethanol gelagert.

2.2.22 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Vektor NTI (Invitrogen). Sequenzvergleiche mit Datenbanken erfolgten mit Hilfe des „BLAST“-Algorithmus.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Transiente Expression in *N. benthamiana* Blättern

Rekombinante Proteine wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Dafür wurden Glyzerin-Dauerkulturen der *Agrobacterien* mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt auf YEB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert. Vom Festmedium wurden 10 ml YEB Flüssigkultur dicht mit den *Agrobakterien* angeimpft und für etwa 16 h bei 28 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Zusätzlich wurde ein *A. tumefaciens* Stamm, der den Silencing-Inhibitor 19K exprimiert, angeimpft.

Die ÜNs mit dem jeweiligen Expressionskonstrukt, sowie der Stamm 19K wurden bei 3000 x g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in *Agrobakterien* Puffer (10 mM MES; 10 mM

MgCl₂ ; 150 µM Acetosyringon; in H₂O) vorsichtig resuspendiert. Die OD₆₀₀ für jedes Expressionskonstrukt wurde auf 0,5 eingestellt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Stamm 19K wurde zu den *A. tumefaciens*, mit den jeweilige Expressionskonstrukten so zugegeben, das er eine OD₆₀₀ von 0,3 in den Lösungen einnahm. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze wurden die Bakterien durch einen Rasierklingen-Schnitt in den apoplastischen Raum von *N. benthamiana*- Blättern ca. vier Wochen alter Pflanzen infiltriert. Nach 3 Tagen konnten Blattproben zur weiteren Analyse entnommen werden.

2.3.2 Proteinextraktion nach transienter Expression Strep II markierter Proteine in *Nicotiana benthamiana*

Die Aufreinigung der Strep II markierten Proteine erfolgte nach Witte et al., 2004. 0,5 g Blattmaterial aus infiltrierten *N. benthamiana*-Blättern wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und 1,5 ml Proteinextraktionspuffer zugegeben. Nach vollständigem Auftauen der Proben wurden diese bei 16.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, um Zellbruchtrümmer und unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand (Rohextrakt) wurde abgenommen, und zur Affinitätsreinigung der transient exprimierten, Strep II markierten Proteine 30 µl Strep-Tactin dazugeben. Dabei interagiert der Strep II Tag mit immobilisiertem Strep-Tactin, einem speziell hergestellten Streptavidin. Nach 15 Minuten Inkubation im Überkopfschüttler bei 4 °C, wurde der Rohextrakt abgenommen und das Strep-Tactin 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Das Strep-Tactin wurde in 50 µl Waschpuffer aufgenommen und Aktivitätstests erfolgten mit immobilisiertem Enzym. Zur Proteindetektion mittels Westernblot wurden 10 µl mit 3 µl 5 x Proteinladepuffer vermischt.

Proteinextraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 20 mM DTT, 0,5 mM AEBSF, AL-Mix (2µg/ ml Antipain und 2µg/ ml Leupeptin) , 2 µl/ml Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma, Steinheim), 10 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM β-Glycerophosphat, 100µg/ml Avidin, 0,5 % (v/v) Triton[®]X-100, in H₂O

Waschpuffer: 100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, in H₂O

2.3.3 Proteinextraktion StrepII markierter Proteine aus stabil transformierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

6 g *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert und 10 ml Proteinextraktionspuffer zugegeben. Nach vollständigem Auftauen der Proben wurden diese bei 16.000 x g und 4 °C für 40 min zentrifugiert, um Zellbruchtrümmer und unlösliche

Bestandteile abzutrennen. Der Überstand (Rohextrakt) wurde abgenommen, und zur Affinitätsreinigung der exprimierten Strep II markierten Proteine 20 µl Strep-Tactin dazugeben. Dabei interagiert der Strep II Tag mit immobilisiertem Strep-Tactin, einem speziell hergestellten Streptavidin. Nach 15 Minuten Inkubation im Überkopfschüttler bei 4 °C, wurde der Rohextrakt abgenommen und das Strep-Tactin 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Das Strep-Tactin wurde in 50 µl Waschpuffer aufgenommen. Zur Proteindetektion mittels Westernblot wurden 10 µl mit 3 µl 5 x Proteinladepuffer vermischt. Proteinextraktionspuffer und Waschpuffer, siehe 2.3.1

2.3.4 Kinaseaktivitätsbestimmung

Gereinigte Kinasen wurden in einem Kinasetest mit Syntide 2 als artifiziellem Peptidsubstrat, beziehungsweise Histon als Proteinsubstrat verwendet. Vergleichbare Kinasmengen wurden mit Hilfe von Western-Blots nach Strep II-Aufreinigung eingestellt. Ein Standard-Kinaseansatz von 30 µl enthielt: 50 mM HEPES, pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 5 µM CaCl₂; 2 mM DTT, 10 µM Syntide 2; 100 µM ATP und 3 µCi [γ -³²P]-ATP. Die Negativkontrolle enthielt statt des Calciums 2 mM EGTA. Die Kinasereaktionen wurden nach 6 Minuten durch Zugabe von 3 µl 10 % Phosphorsäure gestoppt. 20 µl Reaktionsansatz wurden auf Anionenaustauscher-Papier (P81) pipetiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Papier mit 1 %iger Phosphorsäure gewaschen und die verbleibende Radioaktivität mittels Szintillationszählung bestimmt.

Zur Auswertung der Auto- und Transphosphorylierungsaktivität wurde 10 µl des Reaktionsansatzes auf ein 10 % Acrylamid Gel aufgetragen und die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel vakuum-getrocknet und die radioaktiven Signale mittels Einlesen einer auf das Gel aufgelegten Phosphoimager-Platte (BAS-MS, Fujifilm, Japan) im FLA 2000 (Fujifilm, Japan) detektiert.

2.3.5 In Gel Kinase Test (nach Romeis et al., 2000)

Gleiche Proteinmengen aufgereinigter Enzyme, beziehungsweise Rohextrakt wurden auf ein SDS Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur 2 mal 30 min in Puffer A (50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; 20 % Isopropanol), 2 mal 30 min in Puffer B (50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; 5 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen und zum Denaturieren eine Stunde in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; 5 mM β -Mercaptoethanol; 6 M Guanidiniumhydrochlorid inkubiert. Über Nacht

erfolgte die Renaturierung bei 4 °C in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; 5 mM β -Mercaptoethanol; 0,04 % Tween 20, wobei der Puffer mehrmals gewechselt wurde. Vor der Kinasereaktion wurde das Gel 30 min in Puffer E (40 mM HEPES-Puffer pH 7,4; 2 mM DTT; 15 mM MgCl₂; 0,1 mM EGTA; 500 μ M CaCl₂) equilibriert. Zum Starten der Kinasereaktion wurden 25 μ M ATP und 50 μ Ci γ -P³²-ATP zugegeben. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 % Trichloressigsäure, 1 % Phosphorsäure in H₂O abgestoppt. Anschließend wurde das Gel 6 mal je 30 min in der Stopplösung gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Zur Detektion der Kinaseaktivität wurde eine Phosphoimager Platte (BAS-MS, Fujifilm, Japan) aufgelegt.

2.3.6 Proteinbestimmung (Bradford-Methode)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Proteinassay-Reagenz (Bio-Rad, München) wie im Herstellerprotokoll beschrieben. Die Absorption wurde in 96 Well-Mikrotiterplatten bei 595 nm im Microplate Spectralphotometer μ QuantTM (Biotek Industries, Bad Friedrichshall) gemessen. 5 μ l einer geeigneten Verdünnung des Proteinextraktes (zwischen 1:5 und 1:10) wurden mit 200 μ l Bradford-Lösung (1:5 in H₂O verdünnt) gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde in dreifacher Wiederholung anhand einer BSA Eichgeraden bestimmt.

2.3.7 Denaturierende SDS-PAGE

Die Proteinauftrennung erfolgte entsprechend ihres scheinbaren Molekulargewichtes in 10-15 %igen kontinuierlichen Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) in Mini- SDS-Gelapparaturen (Bio-Rad, München). Für die Elektrophorese wurde 1 x Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit 1/5 Vol. 5 x Probenpuffer (50 M Tris/ HCl, pH 6,8; 10 % SDS; 30 % Glycerol; 1 M DTT; 0,4 % Bromphenolblau) versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Als Größenstandard diente „SeeBlue“ (Bio-Rad, München). Nach der Trennung erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran.

Zur Untersuchung der Mobilitätsveränderung von CDPKs nach Calciumbindung wurden die Enzyme mit Probenpuffer, der 1 mM CaCl₂ oder 5 mM EGTA enthielt, vor dem Proteinauftrag auf ein SDS-Gel versetzt.

2.3.8 Western Blot

Mittels Western-Blot wurden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend erfolgte eine Detektion mit Antikörpern. Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (HybondTM-ECLTM, GE-Healthcare, Freiburg) erfolgte in dem miniPROTEAN[®] System (Biorad) bei 100 V für 1 h bzw. 40 V für 14 h unter Verwendung von Transferpuffer (48 mM Tris/ HCl, pH 8,3; 40 mM Glycin; 20 % Methanol). Die Membran konnte zur Überprüfung der Gleichbeladung mit Ponceau S-Lösung (0,2 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure) eingefärbt werden. Nach 1-2 Minuten Inkubation wurde die Lösung abgeschüttet und die Membran mit H₂O gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Membran wurde zur Bestätigung der Gleichbeladung eingescannt.

2.3.9 Immunodetektion von StrepII markierten Proteinen

Zur Detektion StrepII markierter Proteine wurde das Strep-Tactin (Streptavidin)- HRP (horse radish peroxidase)- Konjugat verwendet. Die Detektion erfolgte über eine enzymatische Reaktion des an das Konjugat gebundenen Enzyms. Nach einstündiger Strep-Tactin (Streptavidin)- HRP-Konjugat Inkubation erfolgte die Detektion mittels ECL (Supersignal[®] West Femto bzw. Piko Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, USA). Dieses dient als Substrat für die Alkaline Phosphatase und wird zu einem fluoreszierendem Produkt umgesetzt.

Für die Blotentwicklung wurde die Membran eine Stunde in 20 ml Blockierlösung blockiert. (Blockierlösung: 5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer). Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T (25 mM Tris/HCl, pH: 7,5; 100 mM NaCl; 0,05 % Tween 20) gewaschen und 10 min in 2 µg/ ml Avidin in TBS-T inkubiert, um eine unspezifische Detektion von biotinylierten Proteinen durch das Strep-Tactin (Streptavidin)-Konjugat zu verhindern. In diese Lösung wurde das entsprechenden Strep-Tactin (Streptavidin)-Konjugat (1:4000) gegeben und eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde zweimal 10 min mit TBS-T und einmal 10 min mit TBS gewaschen. Die Proteindetektion erfolgte entsprechend dem verwendeten Strep-Tactin (Streptavidin)-Konjugat.

2.3.10 Immunodetektion phosphorylierter MAP-Kinasen (TEY Western)

Zur Detektion phosphorylierter MAP-Kinasen wurde ein TEY Western durchgeführt. Dafür wurde die Nitrozellulosemembran 1 Stunde bei Raumtemperatur in 20 ml Blockierlösung blockiert (Blockierlösung: 5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer), 3 x kurz mit TBS-T gespült und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper aTEY (1:1000 in 5% BSA in TBS-T) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS-T wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (1:10.000 in 3 % Milch in 1xTBS-Tween) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS-T wurde die Membran mit dem Femto-ECL-Kit von Pierce entwickelt.

2.3.11 Colloidal Coomassie Färbung

Zur unspezifischer Detektion von Proteinen in SDS-Gelen wurde eine Colloidal Coomassie Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Proteine in dem Gel durch Inkubation in Fixierlösung fixiert, 2 mal kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend 3-4 Stunden in Färbelösung inkubiert.

Fixierlösung: 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure

Färbelösung: 0,6 M Ammoniumsulfat; 0,4 % Phosphorsäure; 0,8 % Coomassie Brilliant Blue Stock (5 g Coomassie Brilliant Blue G-250 in 100 ml destilliertem Wasser); 20 % Methanol

2.3.12 Silberfärbung von SDS-Gelen

Nach der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde eine Silberfärbung der Proteine angefertigt, um die Reinheit aufgereinigter Proteine nachzuweisen. Dafür wurde das Gel eine Stunde in Fixierlösung fixiert und anschließend in Lösung 1 für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für 10 Minuten, wurde das Gel für 30 Minuten in Färbelösung gefärbt. Nach zweimaligem kurzen Spülen mit destilliertem Wasser, wurde das Gel durch Zugabe von Entwicklerlösung entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM EDTA abgestoppt.

Fixierlösung: 30 % Ethanol; 15 % Essigsäure in destilliertem Wasser

Lösung 1: 0,5 M Natriumacetat; 8 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 25 % Ethanol; 0,125 % Glutaraldehyd in destilliertem Wasser

Färbelösung: 6 mM Silbernitrat; 11 % Formaldehyd in destilliertem Wasser

Entwicklerlösung: 2,5 % Na_2CO_3 ; 0,03 % Formaldehyd in destilliertem Wasser

2.4 Pflanzenanzucht

2.4.1 Pflanzenwachstumsbedingungen

Zur vegetativen Vermehrung wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Ökotyp Columbia) auf 2:2:1 P-Erde: T-Erde: Perliet (Gebrüder Patza) angezogen. Nach dem Aussäen wurden die Samen 3 Tage bei 4 °C vernalisiert. Anschließend wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen mit einem Lichtzyklus: 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 22 °C und einer Lichtstärke von 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ gehalten.

N. benthamiana Pflanzen wurden auf Floratonerde (92 % Hochmoortorf; 0,15 % Salzgehalt, pH 5 bis pH 6) kultiviert. Die Samen wurden nach dem Aussäen für drei Tage bei 4 °C vernalisiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert (16 h Photoperiode, 22 °C, Lichtintensität: $\sim 400 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^2$, Luftfeuchtigkeit $\sim 30 \%$). Für die transiente Expression wurden etwa vier Wochen alte Pflanzen verwendet.

2.4.2 Oberflächensterilisierung von Samen

Für die Kultivierung von *Arabidopsis* Pflanzen auf MS-Fest-Medium wurde die Samenoberfläche zuvor sterilisiert.

Dazu wurde zum einen die Methode der Dampfsterilisation verwendet. Etwa 50-100 *A. thaliana* Samen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in einem Kunststoffständer in einen Exsikator gestellt. In den Exsikator wurde 100 ml 12 %ige Hypochloritlösung gegeben und die Entwicklung von Chlorgas mit der Zugabe von 5 ml 37 %iger Salzsäure gestartet. Mit einer Membranpumpe wurde ein Vakuum angelegt, um das Gefäß abzudichten. Die Samen wurde 3-6 Stunden in der Chlorgasatmosphäre inkubiert, danach unter einer Sterilbank aus dem Exsikator entnommen und auf die MS-Platten verteilt.

Als weitere Methode zur Oberflächensterilisierung von Samen diente die direkte Inkubation in flüssigem Natriumhypochlorid. Dafür wurden die Samen zuerst mit 70 %-igem (v/v) Ethanol behandelt. Nach zwei Minuten wurde der Alkohol gegen eine Sterilisationslösung (12 % (v/v) Na-Hypochlorit; 0,2 % (v/v) Tween[®] 20) ausgetauscht und die Samen von *Arabidopsis thaliana* nach kurzem Schütteln für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Samen fünfmal in sterilem tridestilliertem Wasser gewaschen und auf die MS-Platten verteilt.

2.4.3 Stabile *A. thaliana* Transformation

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* wurde die „floral dip“ Methode (Clough und Bent, 1998), angewand. *A. thaliana* Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen bis zum Blühen gebracht. Für die Transformation wurde 100 ml YEB Medium inklusive der entsprechenden Antibiotika mit einer frischen 10 ml *A. tumefaciens* Übernachtskultur angeimpft. Nach 20-stündiger Inkubation bei 28 °C und 180 rpm wurde die Kultur 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und das Pellet in 5 % (w/v) Saccharoselösung mit 0,02 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) resuspendiert und auf eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt. Die Pflanzen wurden für einige Sekunden kopfüber in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend in eine Plastiktüte verpackt. Die Pflanzen wurden im Anschluss unter reduzierten Lichtbedingungen über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ins Gewächshaus überführt. Nach etwa 6 Wochen wurden die Samen geerntet.

2.4.4 Selektion stabiler transgener *A. thaliana* auf Erde

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden direkt auf Erde ausgesät und kultiviert wie zuvor beschrieben. Eine Woche nach Keimung wurden die Pflanzen mit 0,1 % (w/v) BASTA[®] (kommerzielles Produkt auf Glufosinatbasis) besprüht. Nur transgene Pflanzen, die das Phosphinothricin-Acetyltransferase (*PAT*) Gen trugen, überlebten.

2.4.5 Segregationsanalyse auf MS-Medium

Die Segregationsanalyse der T1 und T2 Generation der rekombinanten *A. thaliana* Linien erfolgte auf MS-Festmedium. Dazu wurden oberflächensterilisierte Samen auf Petrischalen mit MS-Festmedium mit 10 µg/ml Phosphinotricin verteilt und zwei Tage bei 4 °C vernalisiert. Danach wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen herangezogen. Nach etwa zwei Wochen konnte leicht zwischen normal entwickelten, resistenten, und chlorotischen, anfälligen Pflanzen unterschieden werden. Die resistenten Pflanzen wurden anschließend auf Erde kultiviert.

2.4.6 Schüttelkultur

Zur Untersuchung der Genexpression nach Stressapplikation wurden Arabidopsispflanzen in Schüttelkulturen kultiviert. Dafür wurde 50 ml 1/2 MS Medium mit 1 % Saccharose in 300 ml Erlenmeyerkolben autoklaviert. Nach Abkühlen des Medium wurden ca. 50

oberflächensterilisierte Arabidopsissamen in das Medium gegeben und 2 Tage bei 4 °C vernalisiert. Die Pflanzen wurden 2 Wochen unter Langtagbedingungen, bei 120 rpm kultiviert. Die Applikation von 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol, oder 50 µM ABA erfolgte direkt ins Medium. Proben wurden über einen Zeitkurs geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.4.7 Keimungstests

Um den Einfluss von NaCl, Mannitol, LiCl und ABA auf das Keimungsverhalten von *Atcpk21* und *Atcpk23* Knockout Pflanzen im Vergleich zu Col-0 Wildtyp zu untersuchen, wurden Keimungstests durchgeführt. Dafür wurden oberflächensterilisierte Samen auf ½ MS Medium, mit und ohne Stressfaktor ausgelegt. Das Pflanzenwachstum erfolgte bei 22 °C und Langtagbedingungen (Lichtzyklus: 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 22 °C) und wurde über eine Woche verfolgt.

2.4.8 Wachstumstests

Um die Langzeitadaption der verwendeten *A. thaliana* Linien an NaCl und Mannitol zu untersuchen, wurden Wachstumstests auf 1 MS Medium durchgeführt. Dafür wurden oberflächensterilisierte Samen auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose ausgelegt und 3 Tage vernalisiert. Nach 4 Tagen Wachstum wurden die Keimlinge auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose, 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl beziehungsweise 300 mM Mannitol umgesetzt. Das Pflanzenwachstum erfolgte bei 22 °C und Langtagbedingungen (Lichtzyklus: 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 22 °C) und wurde über vier Wochen verfolgt.

2.4.9 Phänotypische Charakterisierung auf Erde gewachsener Pflanzen

Um die Toleranz der verwendeten *A. thaliana* Linien auf NaCl, Mannitol und LiCl zu testen, wurden 3 Wochen alte *A. thaliana* drei mal alle 2 Tage mit 300 mM NaCl, 200 mM Mannitol oder 30 mM LiCl behandelt. Das Pflanzenwachstum erfolgte bei 22 °C und Langtagbedingungen (Lichtzyklus: 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 22 °C) und die Ausbildung von stressbedingten Chlorosen wurde über 10 Tage verfolgt.

2.4.10 Pflanzenanzucht und Probenaufarbeitung für Natrium- und Kaliummessungen mittels ICP-MS

Um den Natrium- und Kaliumgehalt der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 nach Exposition mit 100 mM NaCl zu messen, wurden die Töpfe 3 Wochen alter auf Erde gewachsener Pflanzen für 24 Stunden in 100 mM NaCl-Lösung gestellt. Das Pflanzenwachstum erfolgte bei 22 °C und Langtagbedingungen (Lichtzyklus: 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 22 °C). Anschließend wurden die Blätter geerntet, kurz in destilliertem Wasser gewaschen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Trocknung des Materials mittels Lyophilisierung wurde der Natrium- und Kaliumgehalt in der Arbeitsgruppe Harter/ZMBP Tübingen mittels ICP-MS gemessen.

2.4.11 Blatttrocknungstests

Um die Transpirationsstärke zwischen verschiedenen *A. thaliana* Linien zu vergleichen, wurde der Wasserverlust über 4 Stunden durch Wiegen von abgeschnittenen Blättern von jeweils 10 Pflanzen verfolgt und als Prozent des Ausgangsgewichts aufgetragen.

2.4.12 Fluoreszenzmikroskopie

Die Detektion der YFP-Fluoreszenz in *N. benthamiana* und *A. thaliana* Protoplasten nach Expression von YFP markierten Proteinen erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Modell Nikon Eclipse 90i) und zugehörigen YFP-Filtern (Anregungs-Filter 480-520 nm, „beam splitter“ 515 nm, Emissions-Filter 505-565 nm). Mit dem Programm Velocity konnten digitale Bilder aufgenommen werden.

2.4.13 Kreuzung von Arabidopsis-Linien

Durch Kreuzung zweier Arabidopsis-Linien wurden deren Merkmale miteinander vereinigt. Dafür wurden die Staubblätter der paternalen Pflanzen vorsichtig entfernt und der Fruchstand mit dem Pollen einer anderen Linie befruchtet. Für beide Merkmale homozygote Pflanzen wurden über PCR mit genomischer DNA als Template identifiziert.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der beiden CDPKs CPK21 und CPK23 aus *Arabidopsis thaliana* in der Signaltransduktion nach Salz- und hyperosmotischem Stress untersucht werden. Diese beiden CDPKs wurden auf Grund von Genexpressionsdaten von Dr. Joachim Kurth (Daten nicht gezeigt) ausgewählt. Phänotypische Untersuchungen von CPK T-DNA Insertionslinien im Vergleich mit Col-0 Pflanzen identifizierten die beiden am nächsten verwandten CDPKs CPK21 und CPK23 als putative Signalmoleküle der Salzstressantwort in *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien *cpk21* (SALK_029412) und *cpk23* (SALK_007958)

Zur Untersuchung der Rolle von AtCPK21 und AtCPK23 in der Signaltransduktion nach Salz- und hyperosmotischem Stress wurden vergleichende phänotypische Charakterisierungen und Genexpressionsanalysen zwischen Col-0 Wildtyppflanzen und *cpk21* und *cpk23* T-DNA-Insertionslinien durchgeführt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde die *cpk21* Linie SALK_029412 sowie die *cpk23* Linie SALK_007958 verwendet. Beide Gene sind aus acht Exons und sieben Introns aufgebaut. Das *CPK21* Gen ist 2814 bp lang mit einer codierenden Sequenz von 1596 bp. Die Länge der genomischen Sequenz von *CPK23* beträgt 3087 bp mit einer codierenden Sequenz von 1563 bp. Die codierenden Sequenzen beider Gene sind zu 87,2 % miteinander identisch. Abbildung 3.1 stellt schematisch die Position der T-DNA-Insertion in den Genen dar.

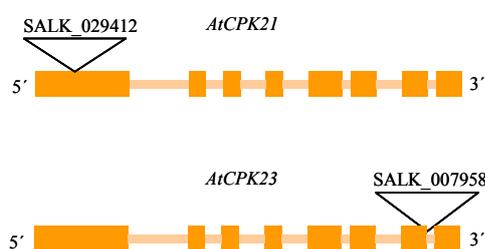


Abbildung 3.1: schematische Darstellung der Position der T-DNA Insertion in den Genen *CPK21* und *CPK23*
 Exon = dunkler Balken
 Intron = heller Balken

Die T-DNA-Insertion der *cpk21* Linie SALK_029412 befindet sich im ersten Exon und die Insertion von *cpk23* SALK_007958 im siebten Intron. Homozygote Pflanzen für die jeweilige T-DNA-Insertion wurden mittels PCR identifiziert und isoliert (Abbildung 3.2).

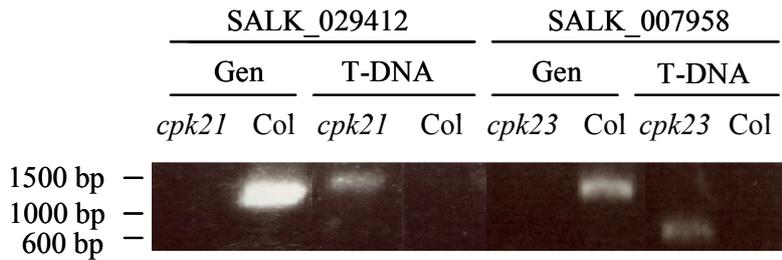


Abbildung 3.2: PCR zur Isolation homozygoter T-DNA-Insertionslinien. Die PCR zum Nachweis der T-DNA-Insertion wurde mit T-DNA-spezifischen Primern und *CPK21*- bzw. *CPK23*-genspezifischen Primern (T-DNA), die PCR zum Nachweis des Wildtypgens wurde mit *CPK21*- bzw. *CPK23*-genspezifischen Primern (Gen) durchgeführt. Als Template diente genomische DNA der Linie SALK_029412 (*cpk21*) sowie genomische DNA der Linie SALK_007958 (*cpk23*). Genomische DNA von Col-0 diente als Positivkontrolle für den Nachweis des Wildtypgens (Col-0).

Des weiteren wurde mittels PCR mit cDNA der Linien *cpk21* und *cpk23* als Template untersucht, ob die T-DNA Insertion zu einem Fehlen des Gentranskripts führte. Als Positivkontrolle wurden die gleichen PCRs mit *CPK21*- bzw. *CPK23*- Plasmid-DNA als Template, durchgeführt (Abbildung 3.3).

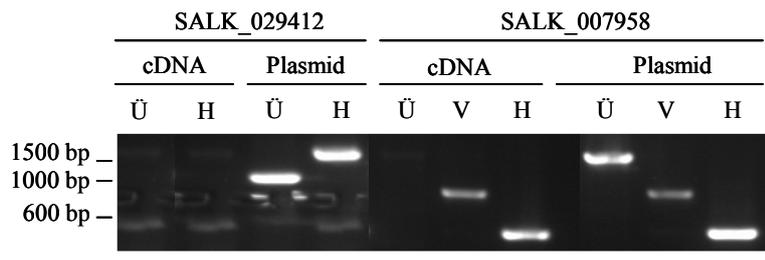


Abbildung 3.3: PCR zur Detektion von *CPK21* und *CPK23* Transkripten in den jeweiligen Insertionsmutanten. Die PCR wurde mit einem Primerpaar durchgeführt, welche die T-DNA-Insertion flankieren (Ü), hinter der T-DNA-Insertion binden (H) bzw. vor der T-DNA-Insertion binden (V). Als Template dienten cDNA der Linien SALK_029412 bzw. SALK_007958 (cDNA) sowie Plasmid-DNA von *CPK21* und *CPK23* (Plasmid).

Die T-DNA Insertion in *cpk21* SALK_029412 führt zu einem vollständigen Verlust des *CPK21* Transkripts. Für die *cpk23* Linie SALK_007958 konnte mit Primern die vor beziehungsweise hinter der Insertion binden, *CPK23* Transkript detektiert werden. Da kein Fragment mit Primern, welche die Insertion flankieren amplifiziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die T-DNA Insertion nicht mit dem Intron gespliced wird und ein funktionsloses „Sinnlos-Transkript“ entsteht.

3.2 Phänotypische Charakterisierung von Col-0, *cpk21* (SALK_029412) und *cpk23* (SALK_007958)

Die *cpk21* und *cpk23* T-DNA Insertionslinien wurden im Vergleich zu Col-0 Wildtyp in Wachstumstests auf NaCl- oder Mannitol-haltigem Medium eingesetzt. Dafür wurden 4 Tage alte Keimlinge der homozygoten Linien nach Keimung auf 1 MS mit 3 % Saccharose auf Medium umgesetzt, welches zusätzlich entweder 100 mM NaCl oder 300 mM Mannitol enthielt.

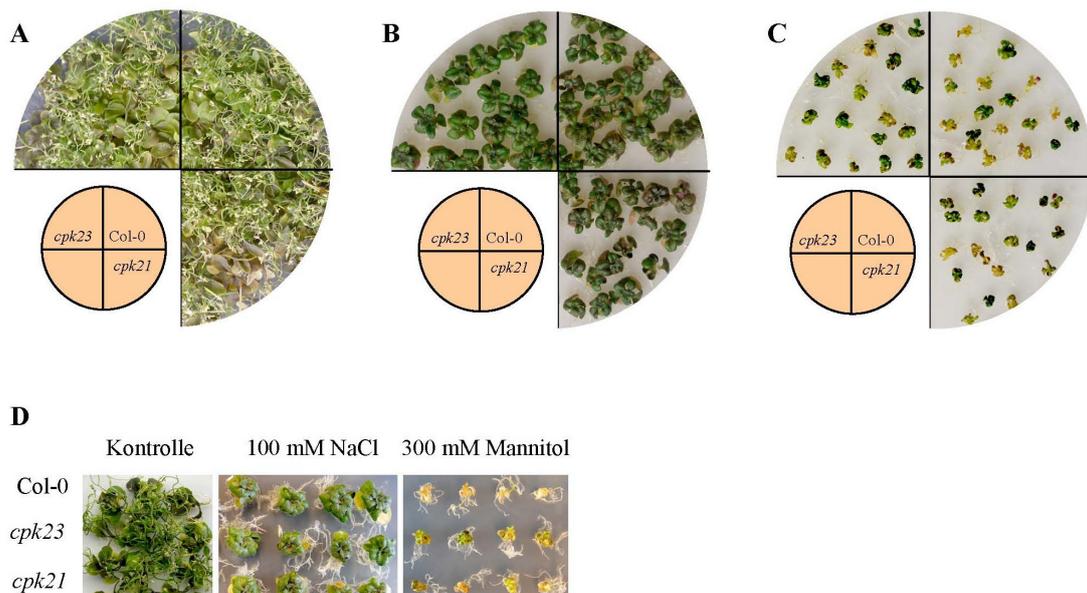


Abbildung 3.4: Wachstum von *A. thaliana* Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21* und *cpk23* auf 1 MS mit 3 % Saccharose (A), 1 MS mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl (B) bzw. 300 mM Mannitol (C). D zeigt repräsentative Pflanzen jeder Linie. Fotos wurden von 4 Wochen alten Pflanzen aufgenommen.

Wie aus Abbildung 3.4 deutlich wird, zeigten die *cpk21* und *cpk23* T-DNA Insertionslinien eine größere Toleranz gegenüber osmotischem Stress als Col-0 Wildtyp. Während die Col-0 Pflanzen nach 4 Wochen Wachstum auf Mannitol-haltigem Medium starke Chlorosen zeigten, wiesen die *cpk21* und *cpk23* T-DNA-Insertionslinien eine bessere Toleranz gegenüber osmotischem Stress auf. Nach 4 Wochen Wachstum auf NaCl-haltigem Medium war allerdings kein Unterschied zwischen den Linien erkennbar.

Neben der phänotypischen Charakterisierung auf MS-Medium, wurden die Linien Col-0, *cpk21* und *cpk23*, sowie die *CPK21* Überexpressionslinie 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 (Generierung siehe 3.3) auf Erde ausgelegt und unterschiedlichen Tests unterzogen. Jeweils 78, drei Wochen alte, unter Langtagbedingungen gewachsene Pflanzen der genannten Linien wurden im Abstand von 2 Tagen mit 300 mM NaCl, 200mM Mannitol bzw. 30 mM LiCl

behandelt. Pflanzen, die Chlorosen zeigten, wurden gezählt und die Ergebnisse statistisch mit dem Programm GraphPad Prism 4 ausgewertet. Abbildung 3.5 zeigt jeweils eine Pflanze jeder Linie 6 Tage nach der ersten Stressapplikation sowie eine graphische Auswertung der Experimente.

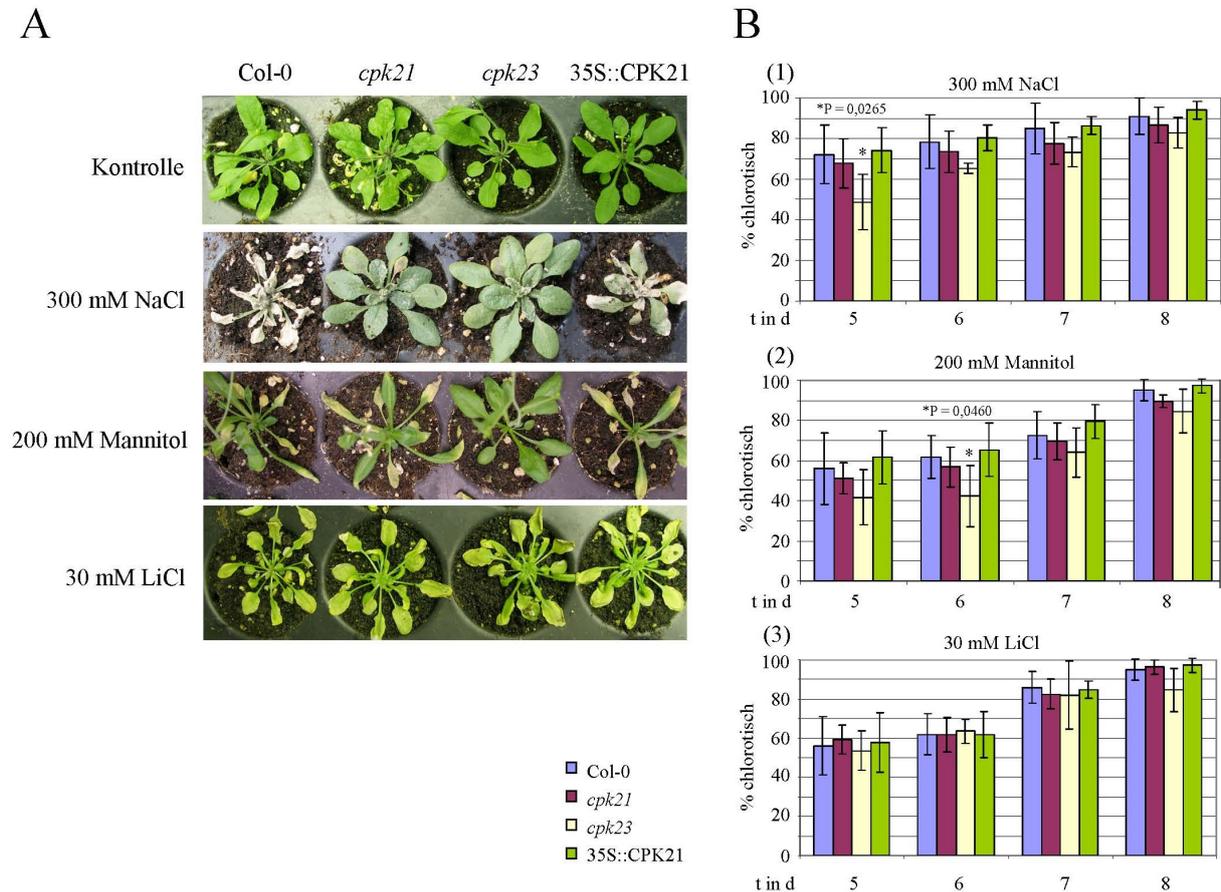


Abbildung 3.5: Wachstum von jeweils 78, 3 Wochen alter Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 unter Kontrollbedingungen und nach dreimaliger Applikation, im Abstand von 2 Tagen, von 300 mM NaCl, 200 mM Mannitol bzw. 30 mM LiCl. (A) Fotos wurden 6 Tage nach der ersten Applikation von 300 mM NaCl, 200 mM Mannitol bzw. 30 mM LiCl aufgenommen. (B) Graphische Darstellung: % chlorotische Pflanzen 5 bis 8 Tage nach der ersten Applikation von 300 mM NaCl (1), 200 mM Mannitol (2) bzw. 30 mM LiCl (3).

Die Linien *cpk21* und *cpk23* zeigten eine erhöhte Toleranz gegenüber 300 mM NaCl (mit schwacher Signifikanz von $*P = 0,0265$ für *cpk23*), verglichen mit Col-0 Wildtyppflanzen. Die *cpk21* Überexpressionslinie 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 zeigte ein ähnliches Verhalten wie Col-0. Mit der Behandlung von Mannitol bzw. LiCl kann unterschieden werden, ob die osmotische – oder die cytotoxische Komponente des NaCl-Stresses zu dem veränderten Phänotyp führt. LiCl ist zehnmal toxischer als NaCl, so dass eine zehnmal niedrigere Konzentration des Salzes ausreicht, um die gleiche cytotoxische Wirkung hervorzurufen, jedoch eine zehnmal geringere hyperosmotische Wirkung durch das Salz ausgeübt wird.

Damit kann unterschieden werden, ob die cytotoxische - oder die osmotische Wirkung von NaCl einen Einfluss auf die Salztoleranz der Pflanzen ausübt. Während die Linien *cpk21* und *cpk23* eine erhöhte Toleranz gegenüber 200 mM Mannitol aufwiesen (mit schwacher Signifikanz von $*P=0,046$ für *cpk23*), verhielten sich alle Linien unter LiCl-Stress identisch. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Toleranz von *cpk21* und *cpk23* auf einer erhöhten Toleranz der osmotischen Komponente des NaCl-Stresses beruht. Darauf deuteten auch die phänotypischen Untersuchungen auf MS-Medium hin (siehe Abbildung 3.4).

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Salztoleranz und Toleranz gegenüber hyperosmotischem Stress der *cpk21* und *cpk23* T-DNA Insertionslinien auf einer verminderten Transpiration und einem damit verbundenem geringeren Transport von NaCl in die grünen Gewebe der Pflanzen beruht, wurde ein Blatttrocknungstest mit den drei Linien, sowie der *CPK21*-Überexpressionslinie 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 durchgeführt. Dafür wurde von jeweils zehn, 3 Wochen alten Pflanzen das Frischgewicht bestimmt und durch stündliches Wiegen der Wasserverlust bestimmt.

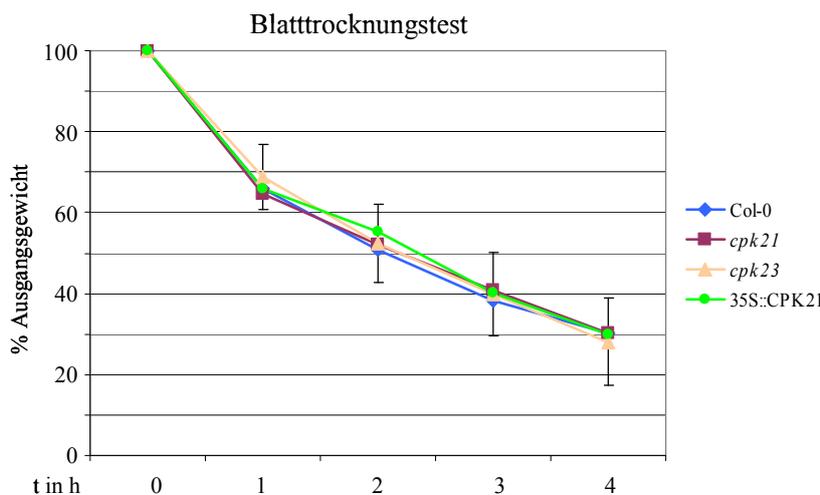


Abbildung 3.6:

Blatttrocknungstest von abgeschnittenen Blättern der Linien Col-0 (blau), *cpk21* (rot), *cpk23* (gelb) und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 (grün). Der Mittelwert von Prozent des Ausgangsgewichts von jeweils 10 Pflanzen pro Linie \pm Standardabweichung wurde angegeben.

Abbildung 3.6 zeigt, dass zwischen den Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und der *CPK21* Überexpressionslinie 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 kein Unterschied in der Transpirationsrate festgestellt werden konnte. Dies widerspricht für *cpk23* den Ergebnissen von Ma und Wu (2007), welche die gleiche SALK-Insertionsmutante charakterisierten. Sie haben für *cpk23* im Vergleich zu Col-0 eine verminderte Stomataöffnung und verminderten Wasserverlust nach Entfernen der Rosettenblätter gezeigt.

Um den Einfluss von CPK21 und CPK23 auf die Keimung unter Hochsalz- bzw. hyperosmotischen Bedingungen zu testen, wurden zusätzlich Keimungstests mit Col-0 und den *cpk21* und *cpk23* T-DNA Insertionslinien durchgeführt. Dafür wurden jeweils 100 Samen der drei Linien auf 1/2 MS Medium und 1/2 MS Medium mit 100 mM NaCl, 200 mM bzw.

300 mM Mannitol sowie 10 mM LiCl ausgelegt und nach drei Tagen Vernalisation die Keimung über einen Zeitraum von vier Tagen verfolgt. Auch hier diente LiCl der Unterscheidung zwischen cytotoxischer und hyperosmotischer Wirkung des Salzes auf die Keimung der einzelnen Linien. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

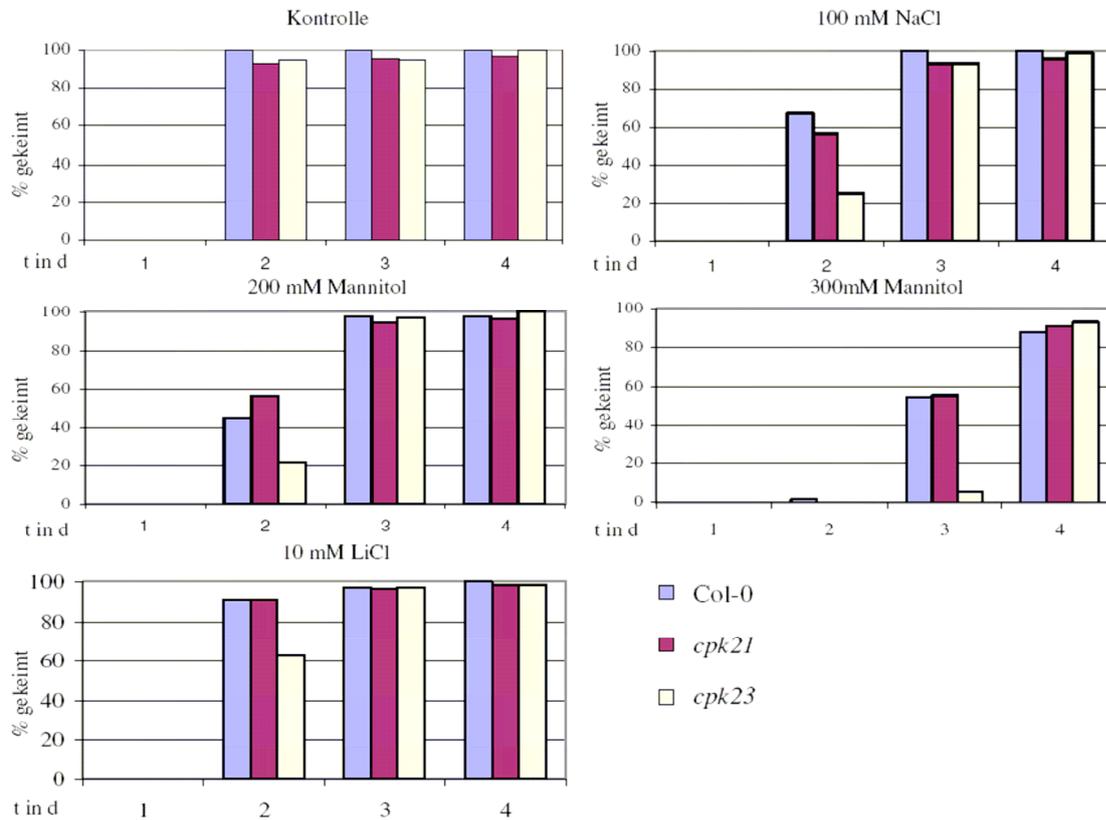


Abbildung 3.7: Keimungstests mit Col-0 (blau), *cpk21* (rot) und *cpk23* (gelb). Jeweils 100 Samen wurden auf 1/2 MS Medium und 1/2 MS Medium mit 100 mM NaCl, 200 mM bzw. 300 mM Mannitol oder 10 mM LiCl ausgelegt und die Keimung wurde nach 3 Tagen Vernalisation über 4 Tage verfolgt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus fünf biologischen Wiederholungen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Abbildung 3.7 zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 5 Wiederholungen des Keimungstests. Während unter Kontrollbedingungen alle 3 Linien gleich gut keimten, war die Keimung von *cpk23* in Anwesenheit von 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol und 10 mM LiCl am zweiten Tag, beziehungsweise am dritten Tag in Anwesenheit von 300 mM Mannitol im Vergleich zu Col-0 verzögert. Die Insertionslinie *cpk21* zeigte das gleiche Keimungsverhalten wie Col-0.

3.3 Phänotypische Analyse von Überexpressionslinien/ Komplementationslinien von *CPK21* in *cpk21* (SALK_029412) und *CPK23* in *cpk23* (SALK_007958) mit verschiedenen Enzymversionen

Der *CPK21* und *CPK23* Genaktivitätsverlust in den Linien SALK_029412 und SALK_007958 wurde mit verschiedenen StrepII markierten Enzymvarianten unter Kontrolle des 35S-Promoters komplementiert. Abbildung 3.8 stellt diese verschiedenen Enzymversionen schematisch dar.

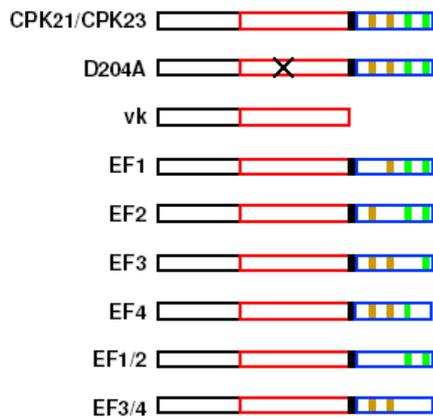


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der verschiedenen Enzymversionen von CPK21 und CPK23.

CPK21/CPK23: Wildtypenzym; D204A: kinase-inaktive Variante von CPK21, vk: verkürzte Version von CPK21 ohne regulatorische Domänen; EF1, EF2, EF3, EF4: Einzelmutationen in jeweils einer der 4 EF-Händen; EF1/2, EF3/4: Doppelmutationen im N- bzw. C-terminalen EF-Handpaar

Bei diesen Enzymvarianten handelt es sich um das Wildtypenzym (CPK21/CPK23), eine verkürzte Version (vk), der die regulatorischen Domänen (Autoinhibitor- und Calmodulin-ähnliche Domäne) fehlen, eine kinase-inaktive Version, bei der der Austausch des Aspartat 204 im aktiven Zentrum gegen ein Alanin zu einer Inhibierung der Enzymaktivität führt (CPK21 D204A), 4 Versionen mit jeweils einer Mutation in einer der 4 EF-Hände (EF1; EF2; EF3; EF4), sowie 2 Versionen mit Mutationen in dem C-terminalen bzw. N-terminalen EF-Hand Paar (EF1/2; EF3/4). Für die Inaktivierung des EF-Hand Motivs wurden die, für die Calciumbindung essentiellen Aminosäuren Aspartat an Position X und Y (erste und dritte Aminosäure des EF-Handmotivs) gegen Alanin ausgetauscht. Diese EF-Hand Mutationen verursachen einen Verlust der Calciumbindefähigkeit. Für CPK21 wurden zusätzlich Linien generiert, die das Wildtypenzym und die kinase-inaktive Version (CPK21 D204A) StrepII markiert unter Kontrolle des nativen *CPK21* Promoters exprimierten. Die *A. thaliana* Linien *cpk21* und *cpk23*, welche Versionen der Enzyme CPK21 und CPK23 mit veränderten Calciumbindeeigenschaften exprimierten, wurden für Wachstumstests auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl bzw. 300 mM Mannitol eingesetzt. Damit sollte untersucht werden, ob aus veränderter Calciumbindung eine unterschiedliche Fähigkeit der Komplementation des Mutantenphänotyps resultiert.

Die Abbildung 3.9 zeigt die Stärke der Genexpression der verschiedenen Versionen von CPK21 in der T3-Generation homozygoter *cpk21 A. thaliana* Linien im Vergleich zu Col-0.

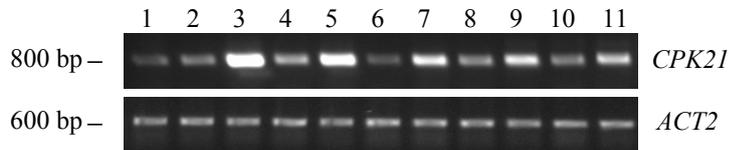


Abbildung 3.9: Genexpression der verschiedenen StrepII markierten CPK21 Versionen in stabil transformierten *cpk21 A. thaliana*

1: Col-0, **2:** 35S::CPK21-StrepII 1.5.9; **3:** 35S::CPK21 EF1-StrepII 2.5.3; **4:** 35S::CPK21 EF2-StrepII 3.9.6; **5:** 35S::CPK21 EF1/2-StrepII 7.1.1, **6:** 35S::CPK21 EF3-StrepII 1.6.9; **7:** 35S::CPK21 EF3/4-StrepII 4.1.3; **8:** 35S::CPK21 D204A-StrepII 1.5.1; **9:** 35S::CPK21 vk-StrepII 2.3.8; **10:** P_{CPK21}::CPK21-StrepII 5.3.1; **11:** P_{CPK21}::CPK21 D204A-StrepII 4.4.6;

Abbildung 3.10 stellt die Ergebnisse der Wachstumstests der *cpk21* Linien, welche unterschiedliche CPK21-Enzymvarianten exprimierten, auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose, 1 MS Medium mit 3 % und 100 mM NaCl bzw. 300 mM Mannitol dar.

Die erhöhte Toleranz von *cpk21* gegenüber hyperosmotischem Stress verglichen mit Col-0 konnte bestätigt werden (siehe auch Abbildung 3.4). Die Wachstumstests auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 300 mM Mannitol zeigten, dass die Fähigkeit zur Komplementation des Mutantenphänotyps von der Enzymversion abhing, die in den Linien exprimiert wurde. Die Linien 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 und P_{CPK21}::CPK21-StrepII 5.3.1, die das Wildtypenzym exprimierten, zeigten dasselbe Ausmaß an Chlorosenbildung wie Col-0. Dies bestätigte, dass die beobachtete erhöhte Toleranz gegenüber hyperosmotischem Stress auf dem Verlust der Genaktivität von *CPK21* beruht. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Linien, welche die Enzymversionen mit den Doppel-EF-Hand-Mutationen, sowie die kinase-inaktiven Versionen exprimierten, wie die T-DNA-Insertionslinien. Auch die osmotische Stresstoleranz der Linien mit Einzel-EF-Hand-Mutation war geringer, als die der *cpk21* T-DNA Insertionslinie, wobei die Linie, welche die Enzymversion mit Mutation in EF3 trug, von diesen drei Linien am intolerantesten gegenüber hyperosmotischem Stress war. Die Linie 35S::CPK21 vk-StrepII 2.3.8 zeigte den gleichen Phänotyp wie *cpk21*. Dies ist verwunderlich, da es sich dabei um eine konstitutiv aktive Enzymvariante handelt. Eventuell wird das Enzym in der Pflanze auf Grund seiner konstitutiven Aktivität vermehrt degradiert, was zu dem beobachteten Phänotyp führt.

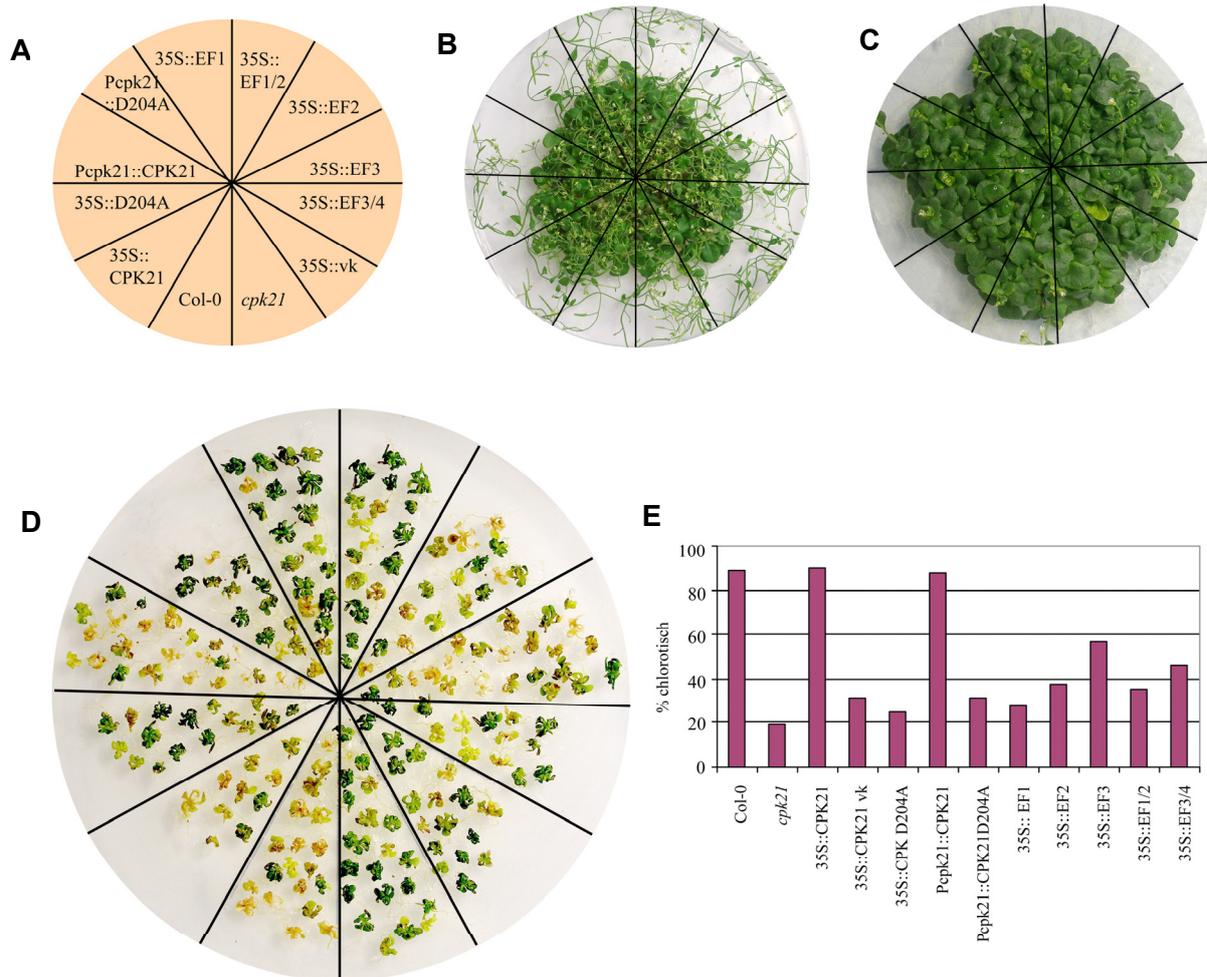


Abbildung 3.10: Wachstumstest von transgenen *A. thaliana* Linien auf 1 MS mit 3 % Saccharose zur Charakterisierung von *CPK21*. Fotos wurden nach 4 Wochen Wachstum auf 1 MS mit 3 % Saccharose (B), 1 MS mit 3 % Saccharose mit 100 mM NaCl (C) bzw. 300 mM Mannitol (D) aufgenommen. Schema der Linien (A), Graphische Darstellung: % chlorotische Pflanzen nach 4 wöchigem Wachstum auf 1 MS mit 3 % Saccharose und 300 mM Mannitol (E)

Abbildung 3.9 verdeutlicht, dass die beobachtete Fähigkeit zur Komplementation des Mutantenphänotyps nicht mit der *CPK21*-Transkriptmenge in den untersuchten Linien korreliert. Die Linien 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 und P_{CPK21}::CPK21-StrepII 5.3.1 besaßen die größte Fähigkeit den Wildtypphänotyp zu restaurieren, produzierten aber *CPK21* mRNA in ähnlichen Mengen wie Col-0. Im Gegensatz dazu zeigten die Linien 35S::CPK21 EF1-StrepII 2.5.3, 35S::CPK21 EF1/2-StrepII 7.1.1 und 35S::CPK21 EF3/4-StrepII 4.1.3 ein geringes Komplementationsvermögen des Mutantenphänotyps, jedoch deutlich höhere *CPK21*-Transkriptmengen als Col-0.

Abbildungung 3.11 zeigt die Genexpressionsstärke der CPK23-Versionen in der T3-Generation homozygoter *cpk23* Linien im Vergleich zu Col-0.

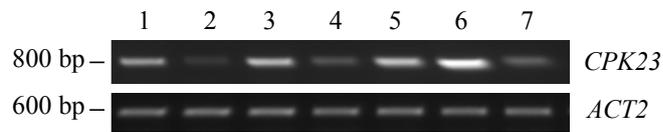


Abbildung 3.11: Genexpression der verschiedenen StrepII markierten CPK23 Versionen in stabil transformierten *A. thaliana*.

1: Col-0; 2: 35S::CPK23-StrepII 10.3.3; 3: 35S::CPK23 EF1-StrepII 6.3.5; 4: 35S::CPK23 EF1/2-StrepII 4.2.1; 5: 35S::CPK23 EF3-StrepII 6.1.1; 6: 35S::CPK23 EF4-StrepII 2.3.1; 7: 35S::CPK23 EF3/4-StrepII 5.6.1

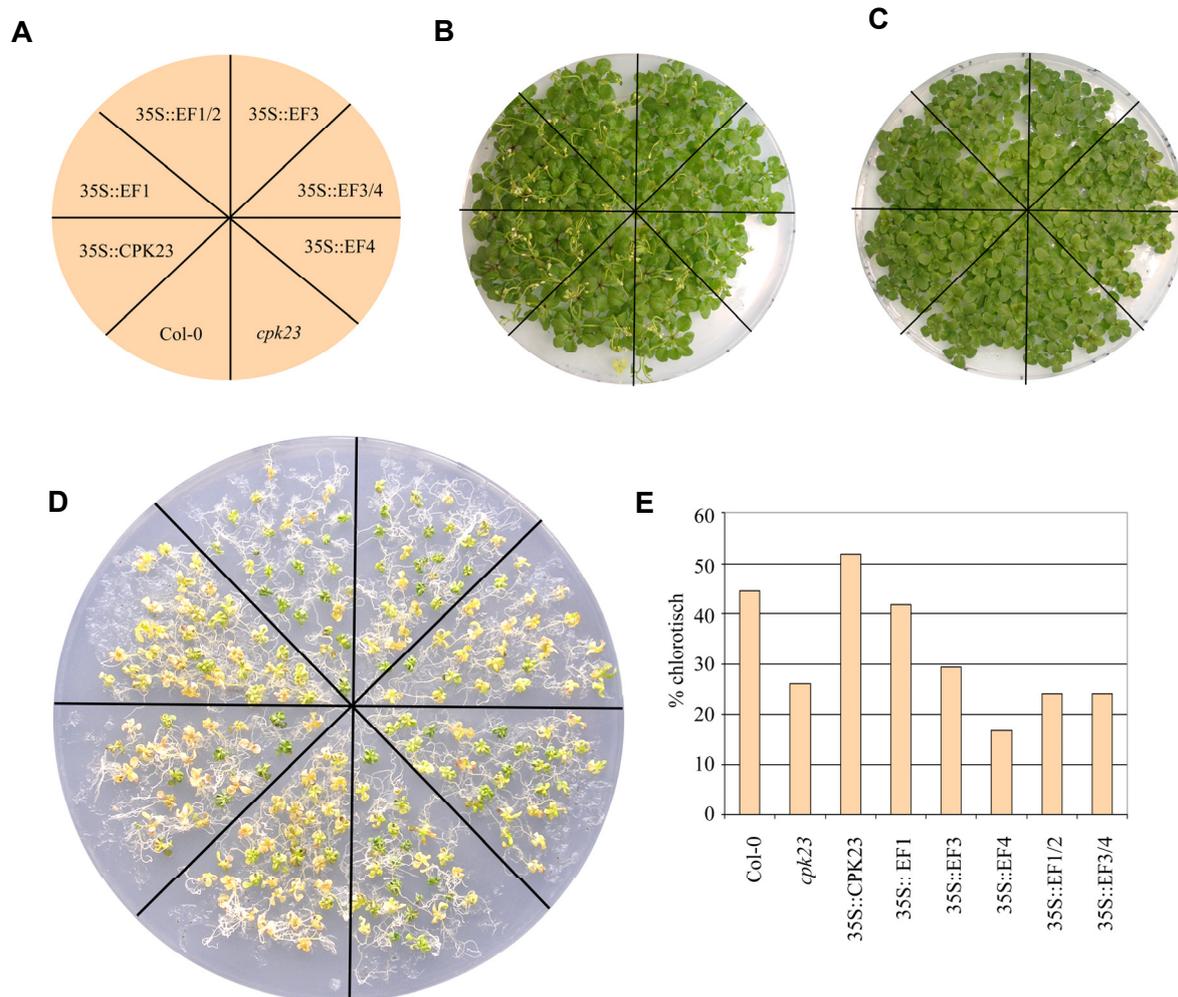


Abbildung 3.12: Wachstumstest von transgenen *A. thaliana* Linien auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose zur Charakterisierung von CPK23. Fotos wurden nach 4 Wochen Wachstum auf 1 MS mit 3 % Saccharose (B), mit 100 mM NaCl (C) bzw. 300 mM Mannitol (D) aufgenommen. Schema der Linien (A), Graphische Darstellung: % chlorotische Pflanzen nach 4 wöchigem Wachstum auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 300 mM Mannitol (E).

Abbildung 3.12 stellt die Ergebnisse der Wachstumstests der *cpk23* Linien, die unterschiedliche CPK23-Enzymvarianten überexprimierten, auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose, 1 MS Medium mit 3 % und 100 mM NaCl bzw. 300 mM Mannitol dar.

Auch für *cpk23* konnte die erhöhte Toleranz gegenüber hyperosmotischem Stress verglichen mit Col-0 bestätigt werden (siehe auch Abbildung 3.4). Auch hier zeigten sich unterschiedliche Fähigkeiten der einzelnen Linien, den Mutantenphänotyp zu komplementieren. Die Linie 35S::CPK23-StrepII 10.3.3, welche das Wildtypenzym exprimiert, zeigte das gleiche Ausmaß an Chlorosenbildung nach hyperosmotischen Stress wie Col-0. Dies bestätigte, dass der beobachtete Phänotyp auf dem Verlust der Genaktivität von *CPK23* beruht. Die Linie, welche die Enzymvariante mit Mutation in EF1 exprimiert, verhielt sich identisch zu Col-0. Dies kann darauf hindeuten, dass EF-Hand 1 von *CPK23* nicht funktional ist, wie man aus der Aminosäuresequenz des Proteins ableiten könnte, da das für die Calciumbindung essentielle Glutamat an Position 12 der EF-Hand 1 durch ein Glutamin ersetzt ist (Proteinsequenz siehe Abbildung 4 im Anhang). Des Weiteren verhielten sich die Linien, welche Enzymversionen mit den Doppel-EF-Hand-Mutationen, sowie die Version EF3 und EF4 exprimierten wie die T-DNA-Insertionslinie. Auch hier kann man aus Abbildung 3.11 ableiten, dass die beobachtete Fähigkeit zur Komplementation des Mutantenphänotyps nicht von der Transkriptmenge der exprimierten Enzymvariante abhängt. Die Linie 35S::CPK23-StrepII 10.3.3 zeigte eine etwas geringere *CPK23*-Transkriptmenge als Col-0, war aber von den untersuchten Linien am besten in der Lage den Wildtypphänotyp zu restaurieren. Im Gegensatz dazu zeigten die Linien 35S::CPK23 EF3-StrepII 6.1.1 und 35S::CPK23 EF4-StrepII 2.3.1 hohe *CPK23* Transkriptmengen mit einem *cpk23* ähnlichen Phänotyp.

3.4 Transkriptionsanalyse nach Stressapplikation

Um zu untersuchen, ob die Genaktivität von *CPK21* und *CPK23* durch Salz- oder hyperosmotischen Stress sowie das in der abiotischen Stressantwort beteiligte Phytohormon ABA beeinflusst wird, wurde die Expression von *CPK21* und *CPK23* nach Stressapplikation untersucht. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob die Expression bekannter abiotischer Stressmarkergene *CPK21*- und *CPK23*-abhängig erfolgt.

Dafür wurden Col-0, *cpk21* und *cpk23* *A. thaliana* Pflanzen hydroponisch in 1/2 MS Medium mit 1 % Saccharose steril und unter Schütteln kultiviert. Nach 2 Wochen Wachstum wurden 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol oder 50 μ M ABA appliziert und Proben über einen

Zeitkurs von 0, 1, 3, 6, 10 und 24 Stunden genommen. Die Abbildungen 3.13, 3.14 sowie 3.15 stellen die Ergebnisse der RT-PCR dar.

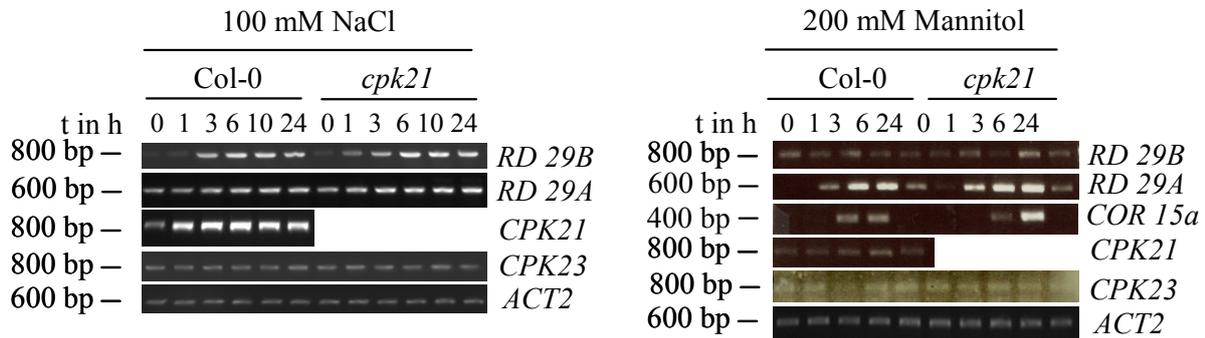


Abbildung 3.13: PCR-Amplifizierung der Markergene *RD 29A*, *RD 29B* und *COR 15a* sowie *CPK21* und *CPK23* über einen Zeitkurs nach Applikation von 100 mM NaCl bzw. 200 mM Mannitol zu den Linien Col-0 und *cpk21*. Actin (*ACT 2*) diente als Ladungskontrolle.

Die Transkription von *CPK21* wurde in Col-0 durch Applikation von 100 mM NaCl mit einem Maximum bei 6 Stunden aktiviert. Die Stärke der Expression der Markergene *RD 29A* und *RD 29B* zeigte in *cpk21* keinen Unterschied zu Col-0. Im Gegensatz dazu wurde die Transkription von *CPK21* durch osmotischen Stress nicht reguliert und die Genaktivität der Markergene *RD 29A*, *RD 29B* und *COR 15a* verhielt sich identisch in Wildtyp und T-DNA-Insertionslinie. Die Expression von *CPK23* wurde nicht durch Salz- und osmotischen Stress beeinflusst und es zeigten sich keine Unterschiede in der *CPK23*-Transkriptmenge zwischen Col-0 und *cpk21*. Die Microarray-Analysen auf www.genevestigator.ethz.ch zeigten einen leichten Anstieg der *CPK21* Genexpression nach Salzstress in den Wurzeln und einen deutlichen Anstieg nach osmotischem Stress in grünem Gewebe. Allerdings kann das Programm auf Grund der hohen Sequenzidentität von *CPK21* und *CPK23* nicht zwischen den beiden Genen unterscheiden.

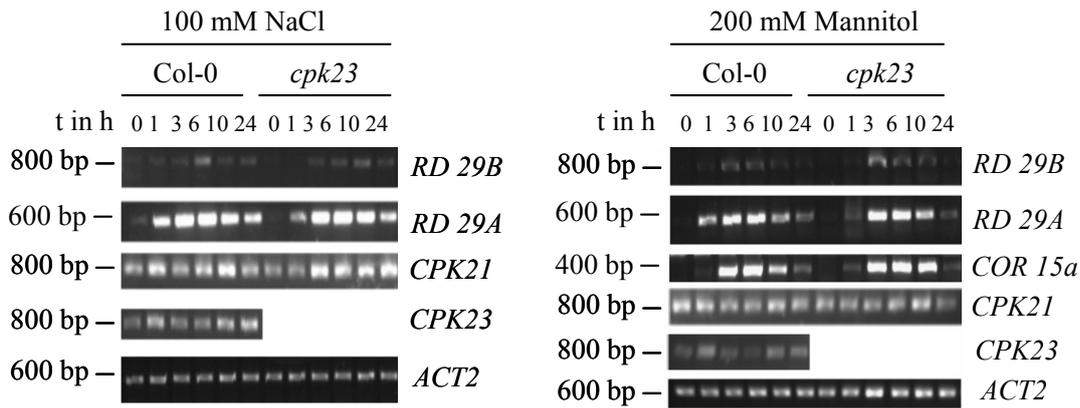


Abbildung 3.14: PCR-Amplifizierung der Markergene *RD 29A*, *RD 29B* und *COR 15a* sowie *CPK21* und *CPK23* über einen Zeitkurs nach Applikation von 100 mM NaCl bzw. 200 mM Mannitol zu den Linien Col-0 und *cpk23*. Actin (*ACT 2*) diente als Ladungskontrolle.

Es konnte bestätigt werden, dass die Transkription von *CPK23* weder durch Applikation von 100 mM NaCl noch durch 200 mM Mannitol beeinflusst wird. Auch die Genaktivität der Markergene *RD 29A*, *RD 29B* und *COR 15a* zeigte keine Unterschiede in Col-0 und *cpk23* nach Applikation von Salz- und hyperosmotischem Stress. Die *CPK21* Transkription wurde, auch in *cpk23*, unter Salzstress, jedoch nicht unter osmotischem Stress aktiviert, wobei keine Unterschiede der *CPK21* Transkriptmenge in Col-0 und *cpk23* beobachtet wurden.

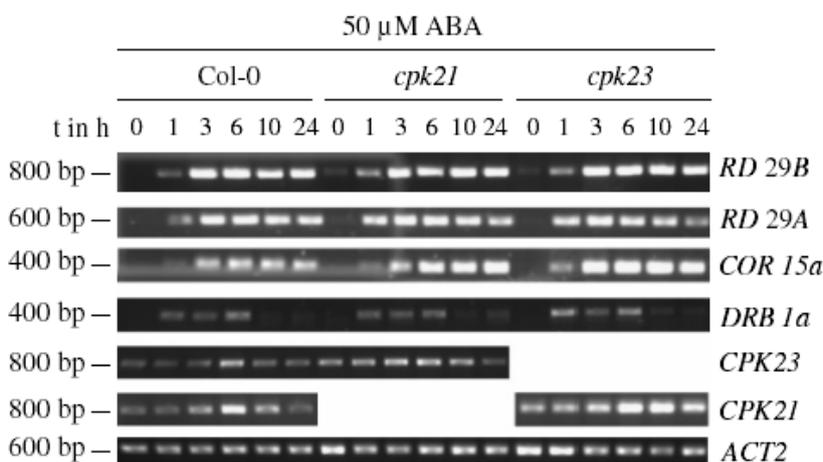


Abbildung 3.15: PCR-Amplifizierung der Markergene *RD 29A*, *RD 29B*, *COR 15a*, *DRB 1a* sowie *CPK21* und *CPK23* über einen Zeitkurs nach Applikation von 50 μ M ABA zu den Linien Col-0, *cpk21* und *cpk23*. Actin (*ACT 2*) diente als Ladungskontrolle.

Die Transkription von *CPK21* und *CPK23* wurde durch die Applikation von 50 μ M ABA mit einem Maximum bei 6 Stunden aktiviert. Die Expression der Markergene *RD 29A*, *RD 29B*, *COR 15a* und *DRB 1a* zeigte keinerlei Unterschiede im Vergleich zwischen den drei Linien. Im Gegensatz dazu zeigten die Microarraydaten der Seite www.genevestigator.ethz.ch keine Veränderung der Genaktivität von *CPK21* oder *CPK23* nach ABA-Applikation.

Des Weiteren sollte die Genexpression von *CPK21*, *CPK23* sowie deren mögliche Regulation der Markergene *RD 29A*, *RD 29B*, *RD22*, *Cor 15a*, *DREB 1a*, *ABI1*, *ABI2*, *ABAI*, *ABF1*, *ABF2*, *ABF4*, *GST6* und *P5CSI* nach 4 wöchigem Wachstum auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl oder 300 mM Mannitol untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten *cpk21* und *cpk23* im Vergleich zu Col-0 eine erhöhte Toleranz gegenüber 300 mM Mannitol, während im Wachstum unter Anwesenheit von 100 mM NaCl kein phänotypischer Unterschied zwischen den Linien sichtbar war (siehe auch Abbildung 3.4). Die ausgewählten Markergene haben eine Funktion in der Antwort auf osmotischen -, cytotoxischen - und oxidativen Stress, ausgelöst durch hohe Salzkonzentrationen und eine Regulation der Expression dieser Gene nach Salz- und hyperosmotischem Stress ist aus der Literatur bekannt.

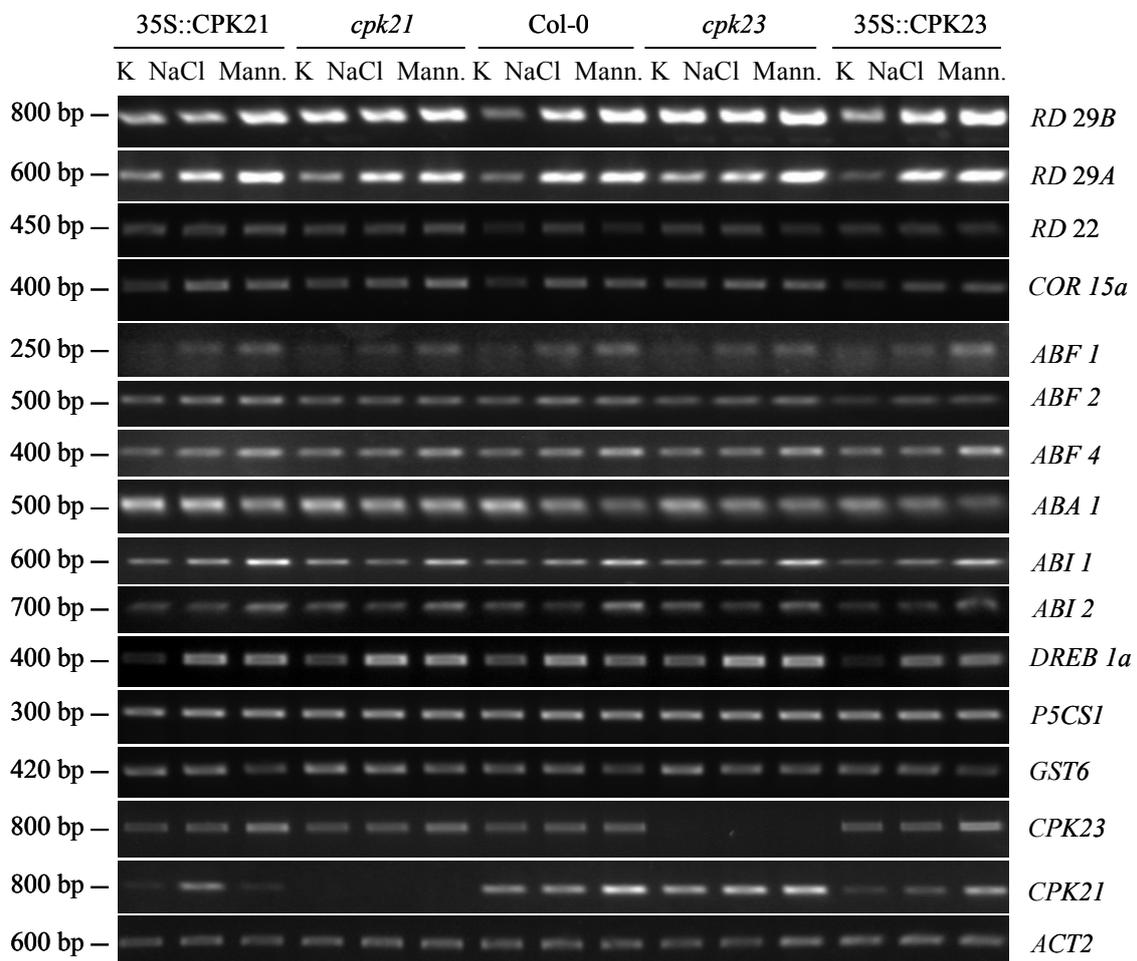


Abbildung 3.16: PCR-Amplifizierung der Markergene *RD 29B*, *RD 29A*, *RD22*, *COR 15a*, *ABF1*, *ABF2*, *ABF4*, *ABAI*, *ABI1*, *ABI2*, *DREB 1a*, *P5CSI*, *GST6* sowie *CPK21* und *CPK23* nach 4 wöchigem Wachstum der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23*, 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 und 35S::CPK23-StrepII 10.3.3 auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose (K), 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl (NaCl) bzw. 300 mM Mannitol (Mann.). Actin (*ACT 2*) diente als Ladungskontrolle.

Abbildung 3.16 zeigt, dass die Transkriptmenge von *CPK21* nach 4 wöchigem Salz- und hyperosmotischem Stress und die Transkriptmenge von *CPK23* dagegen nur nach 4 wöchiger Exposition mit hyperosmotischem Stress im Vergleich zu den Kontrollbedingungen anstieg. Da auch die Transkriptmenge von *CPK21* und *CPK23* in den 35S-Überexpressionslinien nach Stressexposition anstieg, ist davon auszugehen, dass die Expression der beiden Gene vor allem posttranskriptional reguliert wird. Die Stärke der Expression der untersuchten Markergene für abiotischen Stress zeigten in den untersuchten *cpk21* und *cpk23* Insertionslinien sowie den Überexpressionslinien im Vergleich zu Col-0 keine Unterschiede.

3.5 Untersuchungen zur gewebsspezifischen Expression von *CPK21* und *CPK23*

Zur Bestimmung der gewebsspezifischen Expression von *CPK21* und *CPK23* wurden transgene *A. thaliana* Linien generiert, die ein pXCS-GUS Konstrukt mit einem Promoterfragment von *CPK21* bzw. *CPK23* im Col-0 Hintergrund trugen. Diese Linien exprimierten das β -Glucuronidase-Gen unter der Kontrolle des Promoters des jeweiligen Gens. Das Promoterfragment von *CPK21* war 837 bp und von *CPK23* 1219 bp lang. Es wurde aus genomischer DNA amplifiziert und endete direkt am ATG der codierenden Sequenz des jeweiligen Gens.

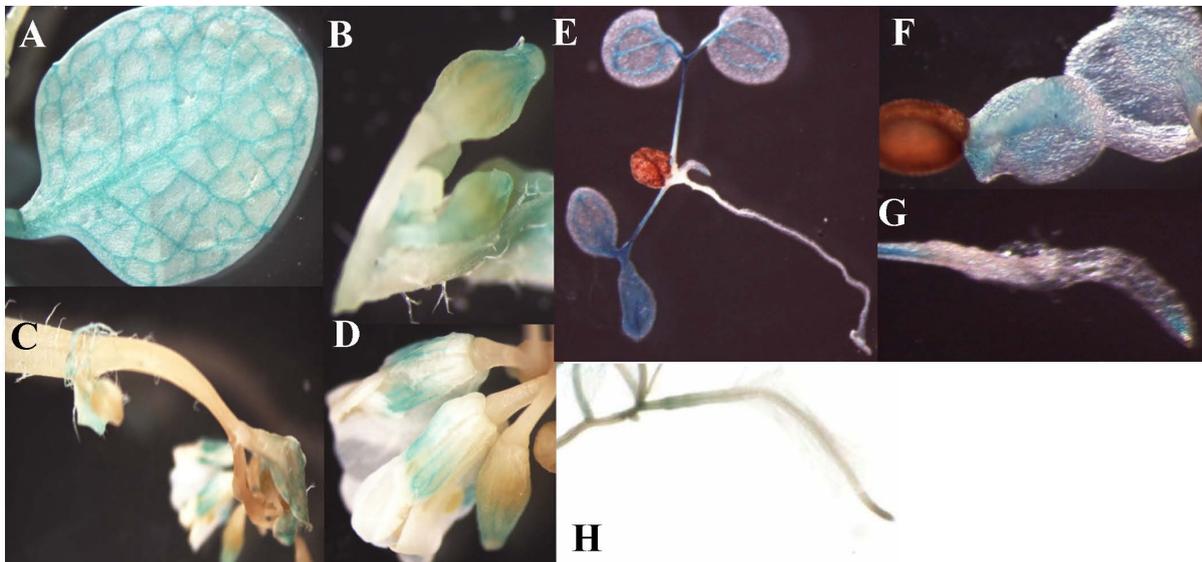


Abbildung 3.17: GUS-Färbung der $P_{CPK21}::GUS$ exprimierenden *Arabidopsis thaliana* Linie 11.3

A: Blatt einer 5 Wochen alten Pflanze; B: geschlossene Blüte; C: Stielblatt; D: offene Blüte; E: 4 Tage alter Keimling; F: Kotyledonen eines 4 Tage alten Keimlings; G: Wurzel eines 4 Tage alten Keimlings; H: Wurzel einer 5 Wochen alten Pflanze

CPK21 wurde vor allem in den Leitgeweben von Blättern exprimiert. Es konnte β -Glucuronidase-Aktivität in den Leitgeweben der Rosettenblätter, Stielblätter und Kelchblätter detektiert werden. *CPK21* Expression wurde sowohl in Keimlingen, als auch in adulten Pflanzen gefunden. Für die Untersuchung der *CPK21*-Expression wurden verschiedene $P_{CPK21}::GUS$ Linien analysiert. Sie zeigten alle das gleiche Expressionsmuster und eine ähnliche Expressionsstärke in den Blättern. Jedoch die Linie 11.3 zeigte auch *CPK21* Expression in der Wurzelspitze (Abbildung 3.17 (G, H)).

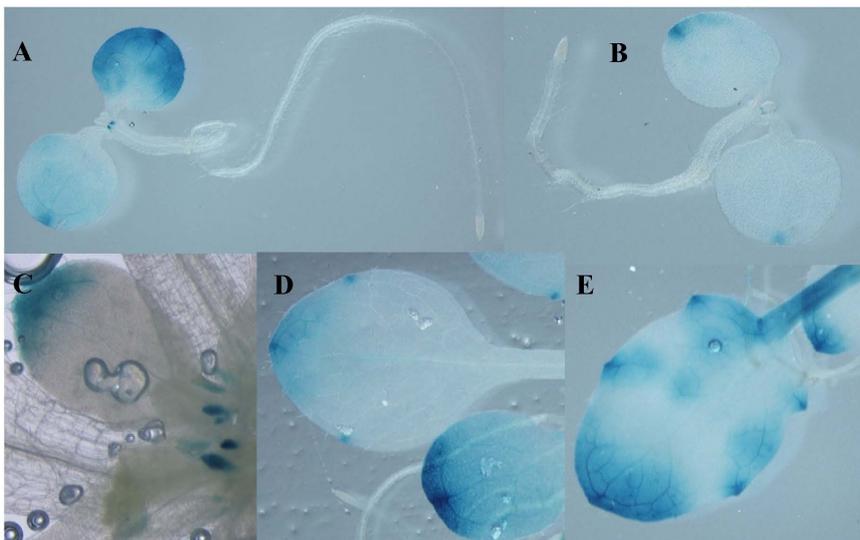


Abbildung 3.18: GUS-Färbung von $P_{CPK23}::GUS$ exprimierenden *A. thaliana*

A: $P_{CPK23}::GUS$ Linie 6.2 in 4 Tage alten Keimlingen, B: $P_{CPK23}::GUS$ Linie 5.3 in 4 Tage alten Keimlingen, C: Blattprimordien in 5 Wochen alten *A. thaliana*, D: Blatt $P_{CPK23}::GUS$ Linie 5.3 in 5 Wochen alten *A. thaliana*, E: Blatt $P_{CPK23}::GUS$ Linie 6.2 in 5 Wochen alten *A. thaliana*

Die durchgeführten Promoter-GUS Untersuchungen wiesen darauf hin, dass *CPK23* nur in den oberirdischen Geweben exprimiert wird. *CPK23* zeigte dort ein sehr auffälliges Expressionsmuster. Es wurde β -Glucuronidase-Aktivität an den Hydatoden und in den Blattprimordien detektiert. Es wurden verschiedene $P_{CPK23}::GUS$ Linien analysiert, welche alle das gleiche Expressionsmuster aufwiesen. Sie unterschieden sich jedoch in der Stärke der Expression. In sehr stark exprimierenden Linien ($P_{CPK23}::GUS$ Linie 6.2) wurde β -Glucuronidase-Aktivität auch in den Blattleitgeweben, ausgehend von den Hydatoden detektiert. *CPK23* wird in Keimlingen sowie in adulten Pflanzen exprimiert. Ma und Wu (2007) zeigten unter Verwendung eines längeren Promoterkonstrukts, als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, *CPK23* Expression in grünen Geweben und der Wurzel.

3.6 Intrazelluläre Lokalisation von CPK21 und CPK23

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von CPK21 und CPK23 wurden C-terminale Fusionskonstrukte von CPK21 und CPK23 mit dem gelb-fluoreszierenden Protein YFP generiert. Die Plasmide pXCSG-YFP CPK21 und pXCSG-YFP CPK23, mit denen das Fusionsprotein unter Kontrolle des 35S-Promoters exprimiert wurde, wurden für die transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* und *A. thaliana* Protoplasten sowie für die Erzeugung stabiler *A. thaliana* Transformanten verwendet. Weiterhin wurden die Plasmide pXCS-YFP CPK21 und pXCS-YFP CPK23 in denen das Fusionsprotein unter Kontrolle des jeweiligen nativen Promotors exprimiert wurde, für die Erzeugung stabiler *A. thaliana* Transformanten verwendet.

YFP-markierte CPK21 und CPK23 aus stabil transformierten *A. thaliana* unter Kontrolle des nativen-, als auch des 35S-Promoters konnte nicht unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden, obwohl das Fusionsprotein mittels Western-Blot unter Verwendung eines YFP-Antikörpers nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nach transienter Expression in *N. benthamiana* und *A. thaliana* Protoplasten unter Kontrolle des 35S-Promoters konnte CPK21 und CPK23 YFP Fusionsprotein fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Abbildungen 3.19 und 3.20).

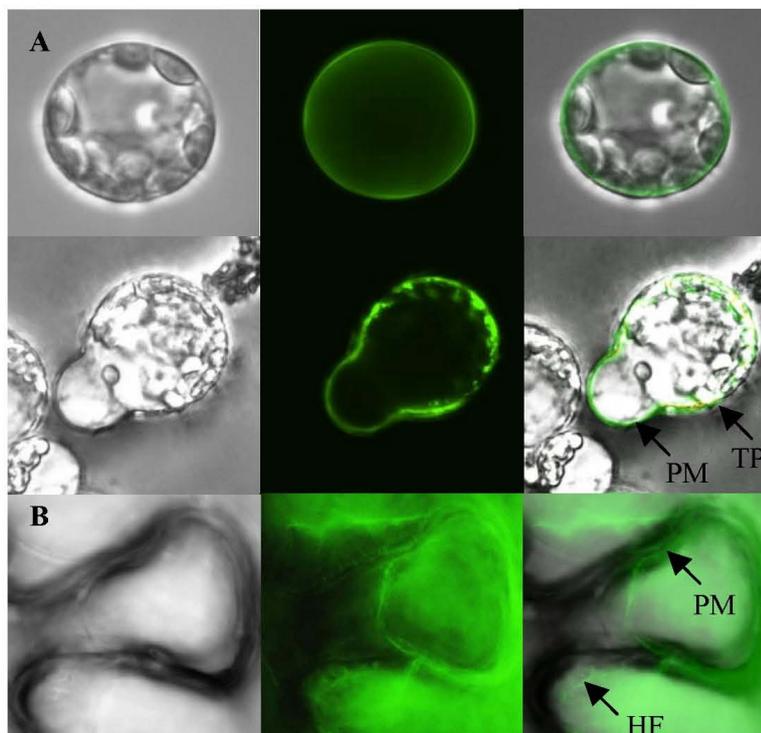


Abbildung 3.19: Transiente Expression von CPK21-YFP unter Kontrolle des 35S-Promoters in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten (A) und *N. benthamiana* Epidermis Zellen (B) PM: Plasmamembran
TP: Tonoplastmembran
HF: Hechtsche Fäden

CPK21-YFP wurde nach transienter Expression in *N. benthamiana* unter Kontrolle des 35S-Promoters in der Plasmamembran lokalisiert. Nach Durchführung einer Plasmolyse mit 100 mM NaCl, konnte man deutlich die sogenannten Hechtschen Fäden erkennen. Dabei handelt es sich um Cytoplasmamembran, die sich beim Schrumpfen der Zelle, ausgelöst durch die Hyperosmolarität der Salzlösung, von der Zellwand löst und nur über die Plasmodesmata mit ihr in Verbindung bleibt.

Nach transienter Expression in *A. thaliana* Protoplasten wurde CPK21-YFP in der Plasmamembran und im Tonoplast lokalisiert. Wird die Plasmamembran von Protoplasten an einer Stelle beschädigt, wölbt sich die Tonoplastmembran heraus. In dieser konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop YFP-markierte CPK21 detektiert werden.

Für CPK23-YFP wurde die gleiche Lokalisation bestimmt, wie für CPK21-YFP. Nach transienter Expression in *N. benthamiana* und in *A. thaliana* Protoplasten wurde CPK23-YFP in der Plasmamembran lokalisiert. Zusätzlich wurde das Fusionsprotein nach transienter Expression in *A. thaliana* Protoplasten am Tonoplast lokalisiert.

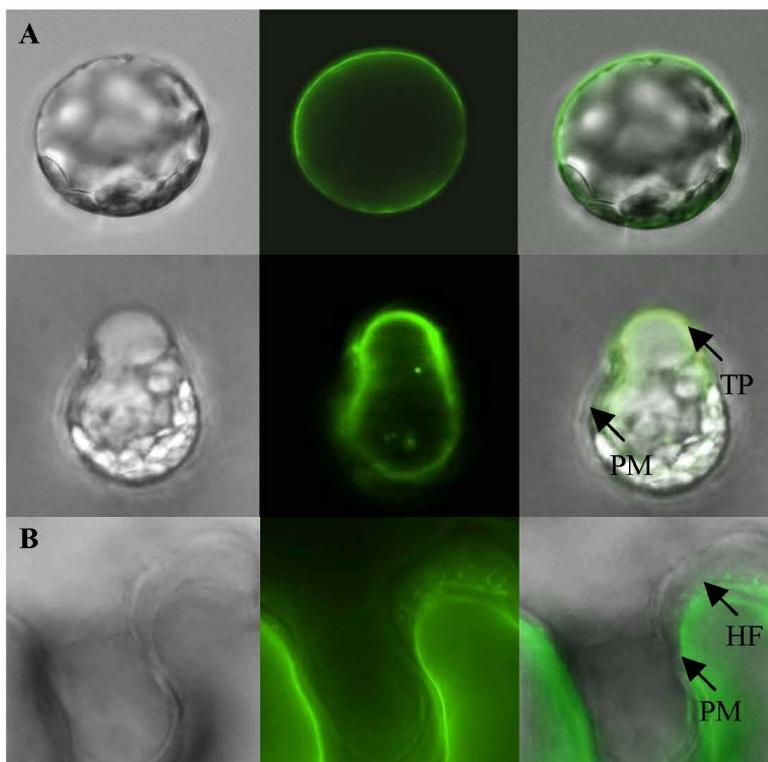


Abbildung 3.20: Transiente Expression von CPK23-YFP unter Kontrolle des 35S-Promoters in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten (A) und *N. benthamiana* Epidermis Zellen (B)

PM: Plasmamembran
TP: Tonoplast
HF: Hechtsche Fäden

3.7 Bestimmung des Na^+ / K^+ -Gehalts in den grünen Geweben von Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9

Na^+ konkurriert mit K^+ auf sehr salzhaltigen Böden um die Aufnahme. Eine vermehrte Na^+ -Aufnahme führt zu einem geringeren K^+/Na^+ -Verhältnis, was sich ungünstig auf biochemische Prozesse auswirkt, da Na^+ mit K^+ um die Bindung an Proteine konkurriert. Einige Daten lassen vermuten, dass vermehrte Kalium-Akkumulation ein wichtiger Faktor für Salztoleranz darstellt (Bordas et al., 1997; Espinosa-Riuz et al., 1999). Auch Ma und Wu (2007) zeigten für die in dieser Arbeit untersuchte, im Vergleich zu Col-0 Salz- und Trockenstressresistentere *cpk23*-Linie, eine Inhibierung der Salzstress-induzierten Reduktion der K^+ -Aufnahme bzw. der K^+ -Akkumulation in den grünen Geweben.

In dieser Arbeit wurde, in Kooperation mit AG Harter/ZMBP Tübingen der Na^+ - und K^+ -Gehalt in den grünen Geweben von jeweils vier Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 mittels ICP-MS in zwei biologischen Replikaten gemessen. (Abbildung 3.21). Dafür wurden auf Erde gewachsene drei Wochen alte Pflanzen 24 Stunden 100 mM NaCl ausgesetzt.

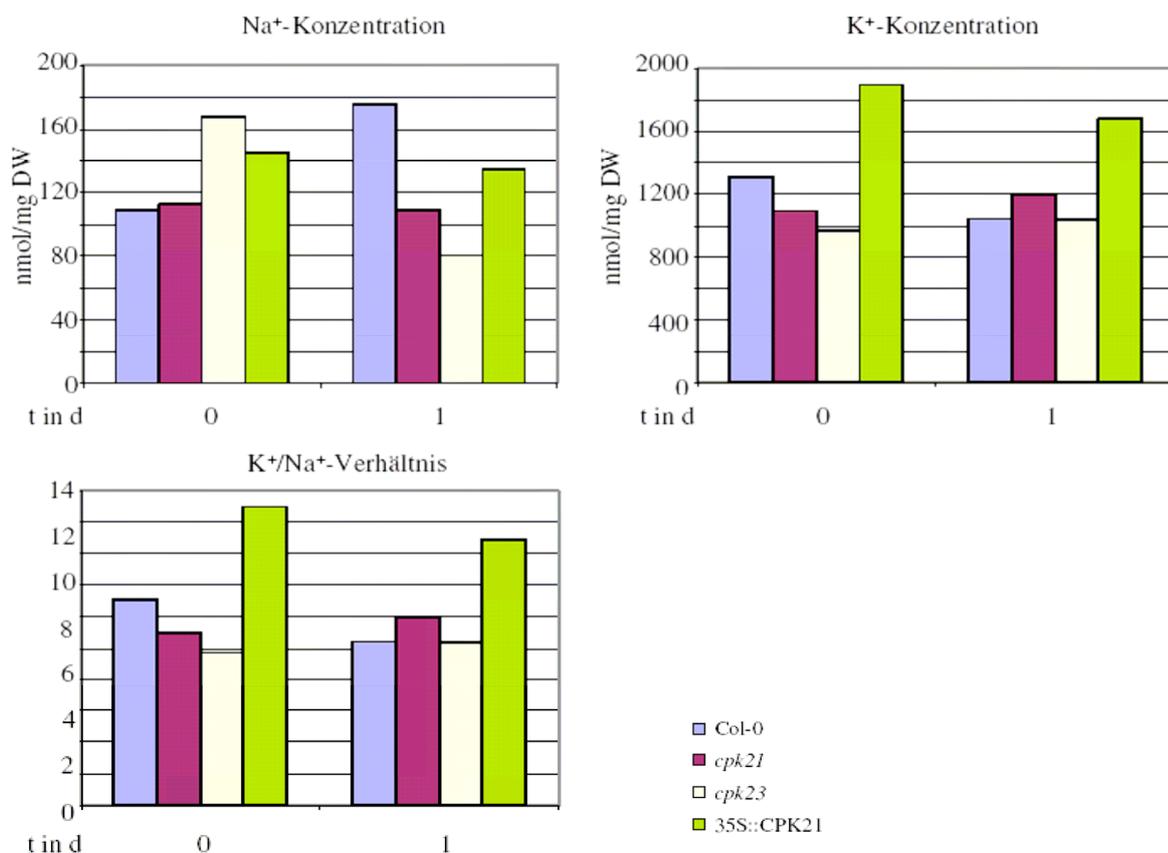


Abbildung 3.21: Na^+ - und K^+ -Gehalt in den grünen Geweben der Linien Col-0, *cpk23*, *cpk21* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9, 0 (0) und 24 Stunden (1) nach Applikation von 100 mM NaCl. Angegeben sind nmol/mg Trockengewicht (DW).

Während die Na^+ -Konzentrationen in Col-0 in den grünen Geweben nach eintägiger Exposition mit 100 mM NaCl anstiegen, wies *cpk23* weniger Na^+ -Ionen auf. Für *cpk21* sowie 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 blieb die Natriumionenkonzentration nach Salzexposition konstant. Der Kaliumgehalt in den grünen Geweben von Col-0 und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 sank, blieb in *cpk23* und *cpk21* jedoch unverändert. Daraus resultierte nach eintägiger Exposition mit 100 mM NaCl ein höheres K^+/Na^+ -Verhältnis in *cpk23* verglichen mit Col-0. *Cpk21* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 zeigten ein insgesamt höheres K^+/Na^+ -Verhältnis als Col-0, was sich durch die Salzexposition kaum verändert. Auffällig ist, dass die Natriumkonzentration in den grünen Geweben von *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 an Tag 0 deutlich über denen von Col-0 lag.

3.8 Biochemische Charakterisierung von CPK21

Für die biochemische Charakterisierung von CPK21 wurden StrepII markierte Versionen des Enzyms unter Kontrolle des 35S-Promoters in *N. benthamiana* exprimiert und über die C-terminale StrepII-Markierung aufgereinigt (Witte et al., 2004). Bei diesen Versionen handelte es sich um das Wildtypenzym, eine kinase inaktive Version (D204A) und in ihrer Calciumbindefähigkeit eingeschränkte Versionen mit Mutationen in einer EF-Hand bzw. dem C-terminalen oder N-terminalen EF-Handpaar.

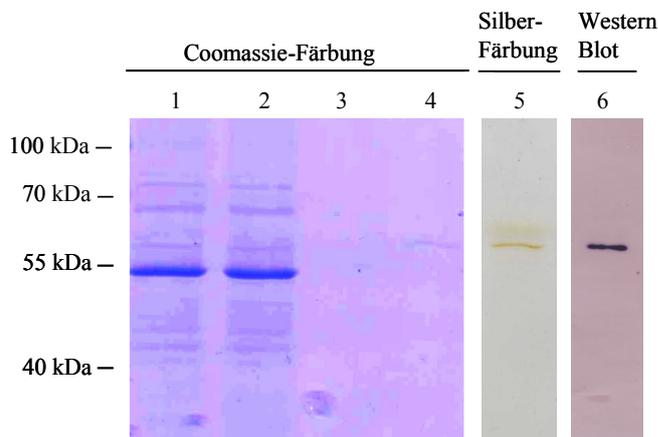


Abbildung 3.22: Aufreinigungsschritte von CPK21-StrepII aus *N. benthamiana* Coomassie-, Silberfärbung und Western Blot-Detektion von:

1. Rohextrakt
2. nicht gebundene Proteine
3. 5ter Waschschriff
4. an Streptaktin-Matrix gebundenes CPK21
5. an Streptaktin-Matrix gebundenes CPK21
6. CPK21-StrepII Nachweis mittels Anti-StrepII

Abbildung 3.22 zeigt, dass CPK21 aus *N. benthamiana* mittels StrepII Markierung aufgereinigt und CPK21-StrepII mit einer molekularen Größe von 60 kDa in einem Western-Blot detektiert werden konnte.

Für anschließende Aktivitätstests wurden die Enzymmengen nach der Western-Blot Detektion mit ECL-Luminiszenz auf die gleiche Konzentration eingestellt.

Zuvor wurde die optimalen Testbedingungen ermittelt. Die Standardaktivitätsmessungen erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 30 μl mit 5 μM CaCl_2 , 1mM MgCl , 10 μM ATP und 0,3 μl [$\gamma\text{-P}^{32}$] ATP (3 μCi) im Reaktionsansatz, bei 37°C über einen Zeitraum von 6 Minuten. In diesem Zeitraum verlief die Phosphorylierungsreaktion mit einer linearen Geschwindigkeit (siehe Abbildung 3.23). Als Negativkontrolle wurde statt des Calciums 2 mM EGTA in den Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 μl 10 % iger Phosphorsäure abgestoppt.

Auch CPK23 konnte analog zu CPK21 aufgereinigt und mittels Western-Blot detektiert werden. Es konnte jedoch auch unter vielfältigsten biochemischen Bedingungen (verschiedene Calcium-Konzentrationen, pH-Werte und Cofaktoren) keine CPK23-Aktivität nachgewiesen werden.

3.8.1 Substratspezifität von CPK21

Um die Substratspezifität von CPK21 zu untersuchen, wurden dem Enzym drei verschiedene Peptidsubstrate in der Endkonzentration 10 μM angeboten.

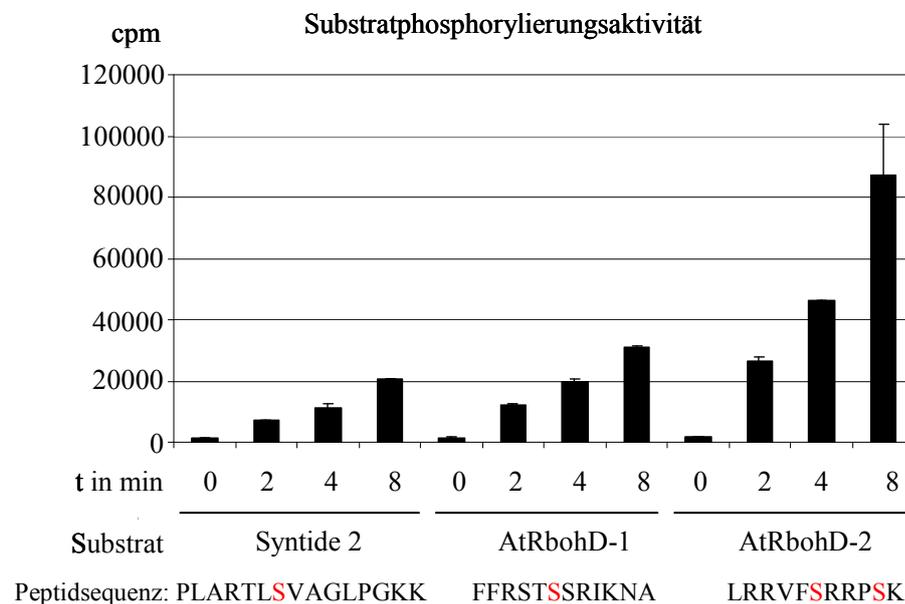


Abbildung 3.23:
Aus *N. benthamiana* aufgereinigtes CPK21-StrepII phosphoryliert drei verschiedene Substrate. Die Inkubation erfolgte über 0, 2, 4 und 8 Minuten unter Standardreaktionsbedingungen.

Abbildung 3.23 zeigt die Phosphorylierung der 3 verwendeten Peptidsubstrate durch CPK21. AtRbohD-1 und AtRbohD-2 sind zwei Peptide der NADPH-Oxidase RbohD aus *A. thaliana*, welche über das klassische Phosphorylierungsmotiv für CDPKs ($\Phi_{.5}\text{-X-R}_{.3}\text{-X-X-S}_0$) verfügen. Syntide 2 wurde in der Literatur mehrfach als gutes Substrat für CDPKs erwähnt und ist

kommerziell im Handel erhältlich (Lee et al., 1998; Harmon et al., 1994). Klassische Phosphorylierungsstellen für CDPKs sind rot in Abbildung 3.23 markiert.

CPK21 phosphorylierte alle drei Substrate mit unterschiedlicher Stärke, wobei AtRbohD-2 am stärksten phosphoryliert wurde. Das kann an den zwei möglichen Phosphorylierungsstellen im Molekül liegen. Für alle Substrate war die Reaktionsgeschwindigkeit im Zeitraum von 8 Minuten linear. Als artifizielles Standardsubstrat für alle nachfolgenden Kinasetests wurde Syntide 2 gewählt.

3.8.2 Biochemische Aktivität von CPK21-EF-Hand Varianten mit Syntide 2 als Substrat

Zur Untersuchung des Einflusses der Calciumbindung auf die Aktivität des Enzyms, wurden verschiedene EF-Hand Mutationen generiert, welche die Calciumbindung an eine (EF1, EF2, EF3 oder EF4) oder zwei EF-Hände (C-terminales oder N-terminales EF-Hand Paar) verhindern. Dafür wurden die für die Calciumbindung essentiellen Aminosäuren Aspartat an Position X und Y (erste und dritte Aminosäure des EF-Handmotivs) gegen Alanin ausgetauscht. Anschließend wurde die Enzymaktivität dieser mutagenisierten Enzymvarianten im Vergleich zum Wildtypenzym in einem Kinasetest mit Syntide 2 als Substrat getestet. Als Negativkontrolle diente die kinase-inaktive Variante D204A, bei der Aspartat 204 im aktiven Zentrum gegen Alanin ausgetauscht wurde, was zu einem Verlust der Enzymaktivität führte.

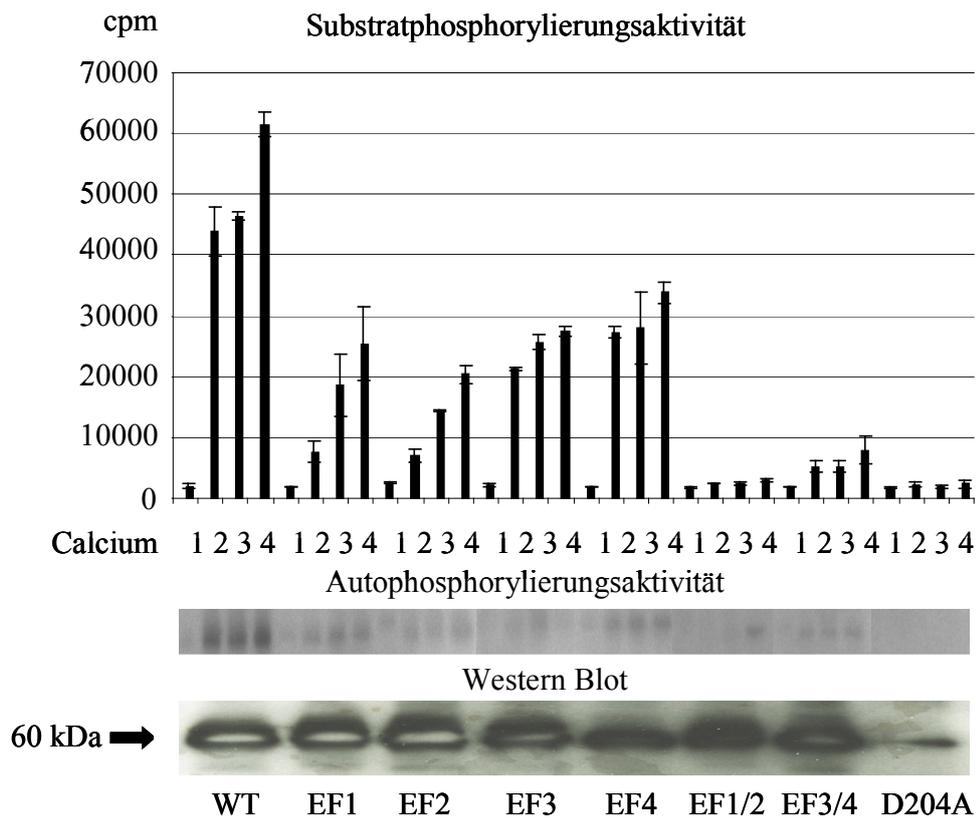


Abbildung 3.24: Aufreinigung, Substrat- und Autophosphorylierungsaktivität von CPK21-StrepII, StrepII markierten AtCPK21 EF-Hand Varianten und CPK21 D204A-StrepII. Die Enzyme wurden in *N. benthamiana* exprimiert und daraus aufgereinigt. Die Aktivitätstest erfolgten mit Syntide 2 als Substrat bei 4 verschiedenen CaCl₂-Konzentrationen (1: 0 μM; 2: 0,05 μM; 3: 0,5 μM; 4: 5 μM)

Abbildung 3.24 zeigt, dass alle beschriebenen Enzymvarianten aus *N. benthamiana* aufgereinigt und mittels StrepII-Markierung in einem Western-Blot detektiert werden konnten. Es ist zu erkennen, dass CPK21 Syntide 2 calciumabhängig phosphorylierte. Ohne Calcium im Reaktionsansatz zeigte das Enzym keine Phosphorylierungsaktivität und mit steigenden Calciumkonzentrationen stieg die Enzymaktivität. Das Wildtypenzym hatte die höchste Aktivität, während die kinase-inaktive Version D204A keine Enzymaktivität besaß. Während die EF-Hand Varianten mit Mutationen in EF3 und EF4 bei der höchsten Calciumkonzentration [5 μM] noch ca. 50 % der Wildtypaktivität besaßen, lag die Aktivität der Varianten EF1 und EF2 hier noch bei ca. 30 % Wildtypaktivität. Noch gravierender fiel der Aktivitätsverlust bei niedrigen Calciumkonzentrationen aus. Während die EF-Hand Mutanten EF3 und EF4 sich ähnlich wie das Wildtypenzym verhielten und auch bei der niedrigsten Calciumkonzentration [0,05 μM] schon ca. 80 % ihrer höchsten Aktivität bei 5 μM CaCl₂ erreichten, war die Aktivität der Versionen EF1 und EF2 in Anwesenheit von 0,05 μM CaCl₂ nur ein Drittel ihrer höchsten Aktivität in der Gegenwart von 5 μM CaCl₂.

Während die Doppelmutation EF3/4 noch etwas Restaktivität zeigte, war die EF1/2 Variante kinase-inaktiv.

Die Autophosphorylierungsaktivität der Enzymversionen verhielt sich analog zu ihrer Transphosphorylierungsaktivität. Sie stieg mit steigenden Calciumkonzentrationen, wobei das Wildtypenzym die höchste Aktivität aufwies und die Version D204A keine Phosphorylierungsaktivität mehr besaß.

3.8.3 Biochemische Aktivität von CPK21-EF-Hand Varianten mit Histon H1 als Substrat

Zusätzlich wurde die Aktivität der einzelnen CPK21 Varianten mit Histon H1 als Substrat und steigenden Calciumkonzentrationen getestet. Dafür wurden 15 µl des Kinasetests in einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine Autoradiographie des getrockneten Gels anfertigt.

Abbildung 3.25 zeigt, dass alle StrepII markierten Versionen von CPK21 aufgereinigt und in einem Western-Blot detektiert werden konnten. CPK21 phosphorylierte auch Histon H1 calciumabhängig und mit Histon H1 als Substrat zeigten die einzelnen Enzymversionen die gleichen Aktivitäten wie mit Syntide 2. Ohne Calcium im Reaktionsansatz zeigte das Enzym keine Trans- und Autophosphorylierungsaktivität und mit steigenden Calciumkonzentrationen stieg die Enzymaktivität. Das Wildtypenzym hatte die höchste Aktivität, während die kinase-inaktive Version D204A keine Enzymaktivität besaß. Die EF3 und EF4 Varianten waren phosphorylierungsaktiver als die Varianten EF1 und EF2. Während die Doppelmutationsvariante EF3/4 noch etwas Restaktivität zeigte, war die EF1/2 Variante kinase-inaktiv.

Auch hier war die Autophosphorylierungsaktivität der Enzymversionen analog zu ihrer Transphosphorylierungsaktivität.

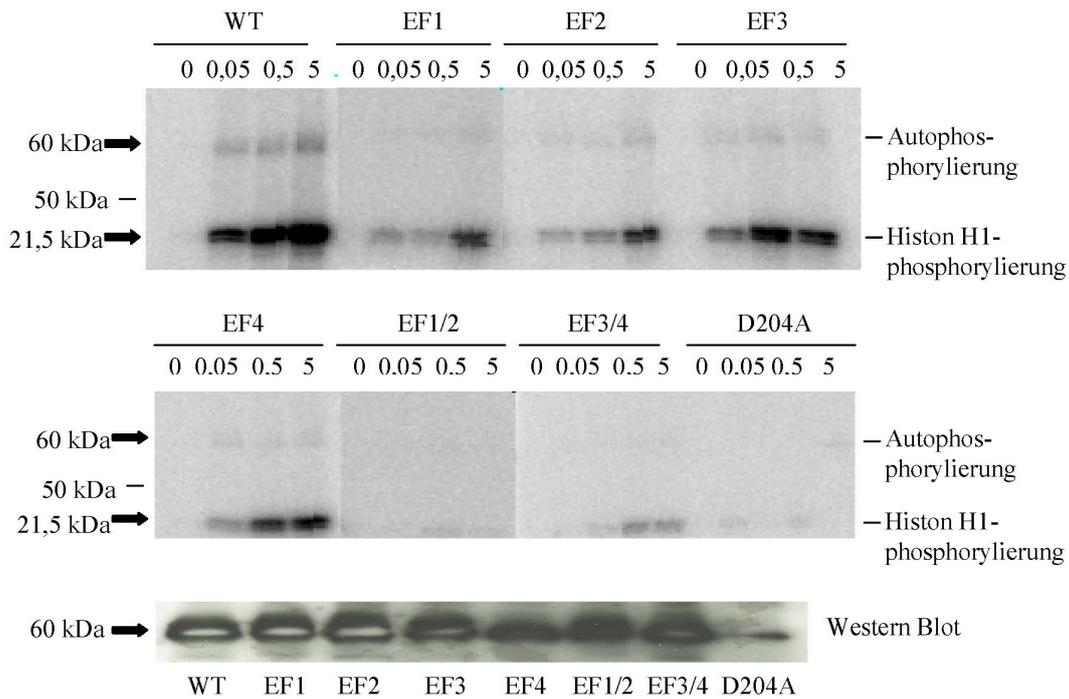


Abbildung 3.25: Autoradiographie von im SDS-Gel aufgetrennten Kinase-Tests mit unterschiedlichen CPK21 Varianten. Die Enzyme wurden aus *N. benthamiana* aufgereinigt, mittels Western Blot detektiert und ein Aktivitätstest mit Histon H1 als Substrat bei 4 verschiedenen CaCl₂-Konzentrationen (0 µM; 0,05 µM; 0,5 µM; 5 µM) durchgeführt.

3.8.4 Elektrophoretisches Lauf-Verhalten der EF-Hand Varianten nach Calciumbindung in der SDS-PAGE

Die in ihrer Fähigkeit zur Calciumbindung veränderten CPK21 Varianten zeigten unterschiedliche Enzymaktivitäten. In dem nächsten Experiment wurde überprüft, ob die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Calciumbindung der EF-Hand Mutationen das Laufverhalten nach Calciumbindung nach Auftrennung in einer SDS-PAGE verändern. Gibt man 1 mM CaCl₂ oder 5 mM EGTA in den Ladebuffer vor dem Proteinauftrag auf ein SDS-Gel, so zeigt die calciumgebundene Form der CDPK ein schnelleres Laufverhalten in der SDS-PAGE im Vergleich zur Calcium-ungebundenen Form (EGTA im Ladebuffer).

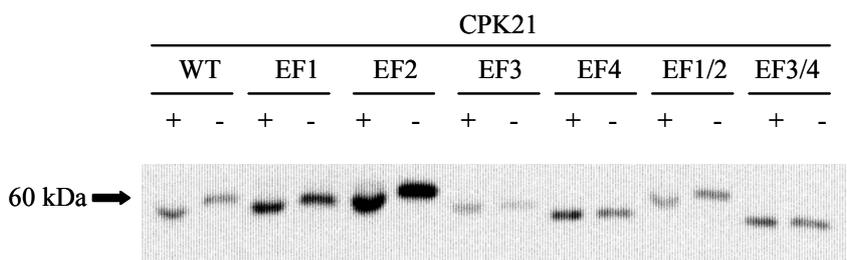


Abbildung 3.26: Laufverhalten von CPK21 Versionen nach Ca²⁺ (+) - bzw. EGTA (-) Inkubation im Laufpuffer

Abbildung 3.26 zeigt die Western Blot Detektion von Ca^{2+} -ungebundener und gebundener Form der EF-Hand-mutagenisierten CPK21 Varianten. Während EF3, EF4 und EF3/4 kaum eine Veränderung des Laufverhaltens nach Calciumbindung im Vergleich zur Calciumungebundenen Form (Inkubation mit EGTA im Laufpuffer) aufwiesen, zeigten das Wildtypenzym, EF1, EF2 und EF1/2 ein stark verändertes Laufverhalten in Abhängigkeit von Calciumbindung.

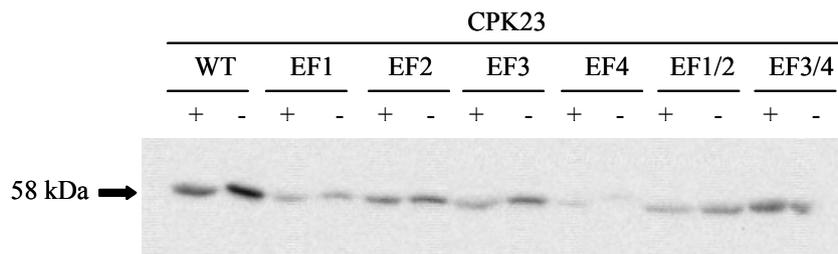


Abbildung 3.27:
Laufverhalten der CPK23 Versionen nach Ca^{2+} (+) - bzw. EGTA (-) Inkubation im Laufpuffer

Abbildung 3.27 zeigt analog die Western Blot Detektion von Ca^{2+} -ungebundener und -gebundener Form der EF-Hand-mutagenisierten CPK23 Varianten. Es wurden die selben Bedingungen gewählt, jedoch war keine ausgeprägte Laufverhaltensänderung zwischen den einzelnen Enzymversionen, bei Vorhandensein oder Fehlen von Calcium im Ladepuffer, erkennbar.

3.8.5 Einfluss der Autophosphorylierung auf die biochemische Aktivität von CPK21

Bei fast allen bisher untersuchten CDPKs wurde Calcium- und Mg-ATP abhängige Autophosphorylierung festgestellt. Es wird angenommen, dass Autophosphorylierung der funktionellen Regulation von CDPKs dient. Um zu untersuchen, ob die Autophosphorylierung von CPK21 einen Einfluss auf die Enzymaktivität des Enzyms hat, wurde die Aktivität von aus *N. benthamiana* aufgereinigter CPK21-StrepII mit und ohne vorheriger 10 minütiger Inkubation mit $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{ATP}$ in einem Kinasetest mit Syntide 2 als Substrat getestet. Die Aktivitätsmessung wurde durch Zugabe des Substrats gestartet und erfolgte über einen kurzen Zeitraum, da angenommen werden muss, dass die Autophosphorylierung und damit die Aktivitätsänderung sehr schnell erfolgt. Zum Beispiel konnten Chauduri et al. (1999) zeigen, dass GnCDPK aus Erdnuss nach 2 Minuten vollständig autophosphoryliert war.

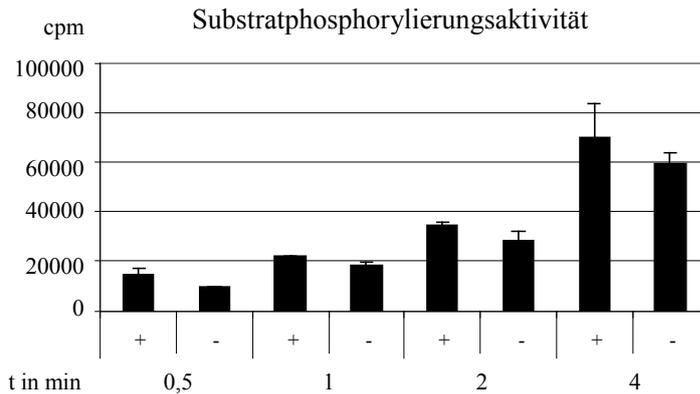


Abbildung 3.28: Standardaktivitätstest von CPK21-StrepII aufgereinigt aus *N. benthamiana* zur Untersuchung des Einflusses der Autophosphorylierung auf die Enzymaktivität. Die Inkubation erfolgte über 0,5, 1, 2 und 4 Minuten. +: 10 min Vorinkubation mit 0,3 µl [γ -P³²]ATP (3µCi); -: ohne Vorinkubation mit 0,3 µl [γ -P³²]ATP (3µCi)

Abbildung 3.28 zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 2 Experimenten. Die Aktivität des mit [γ -P³²]ATP vorinkubierten Enzyms war in allen Messungen höher, als die Aktivität des nicht vorinkubierten Enzyms. Allerdings nahm der Unterschied der Aktivitäten, mit Ausnahme der Messung nach 4 Minuten (die allerdings auch eine hohe Standardabweichung zeigt) ab. Dies deutet darauf hin, dass Autophosphorylierung die Aktivität von CPK21 steigert.

3.9 Biochemische Aktivität von CPK21 nach abiotischem Stress

Auf Grund der erhöhten Toleranz gegenüber hyperosmotischem – und Salzstress der Linien *cpk21* (SALK_029412) und *cpk23* (SALK_007958) sowie der beobachteten Aktivierung der Expression von *CPK21* nach Salzstress, ABA-Applikation und vierwöchigem hyperosmotischem Stress, sollte untersucht werden, ob Salz-, hyperosmotischer Stress und ABA die Aktivität von CPK21 direkt beeinflusst.

3.9.1 *In vitro* Aktivität von CPK21 nach Salzstress

Zur Untersuchung der *in vitro* Aktivität von CPK21 nach Salzstress wurde CPK21-StrepII Wildtyp-Enzym transient in *N. benthamiana* exprimiert. Nach 3 Tagen wurde 100 mM NaCl in die exprimierenden Blätter infiltriert und nach 10 minütiger Inkubation Proben genommen. CPK21 wurde mittels StrepII-Markierung aufgereinigt und die Aktivität vor und nach Salzinfiltration in einem Kinasetest mit Syntide 2 als Substrat bestimmt.

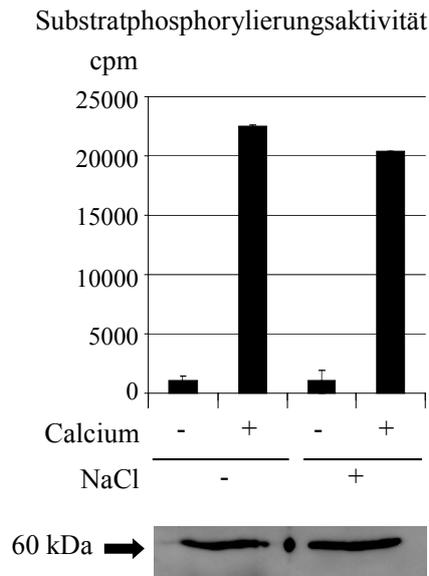


Abbildung 3.29: Biochemische Aktivität von CPK21-StrepII aufgereinigt aus *N. benthamiana* nach Infiltration von 100 mM NaCl. Die Aktivität von CPK21-StrepII vor und nach Applikation von 100 mM NaCl wurde in einem Kinasetest mit Syntide 2 bestimmt.

Abbildung 3.29 zeigt keine Aktivitätssteigerung von in *N. benthamiana* transient exprimiertem CPK21 Wildtyp-Enzym nach Salzstress. Dies kann darauf hinweisen, dass CPK21 durch NaCl-Stress nicht aktiviert wird, oder daran liegen, dass vorgeschaltete Komponenten der Salz-Signaltransduktion, die CPK21 in *A. thaliana* aktivieren in *N. benthamiana* fehlen.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob die Infiltration von 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol, 50 μ M ABA bzw. bidestilliertem Wasser in CPK21-StrepII exprimierende *N. benthamiana* Blätter einen Einfluss auf die Enzymstabilität hat. Es wurde jedoch kein Einfluss der Infiltration auf die Enzymstabilität festgestellt (Daten nicht gezeigt).

3.9.2 *In vivo* Aktivität von CPK21 nach Salz-Stressapplikation

Um zu untersuchen, ob die fehlende Aktivierung von transient in *N. benthamiana* exprimierter CPK21 auf das Fehlen vorgeschalteter Signaltransduktionskomponenten für das Arabidopsis Protein zurück zu führen ist, wurde die Aktivität des Enzyms nach Stressapplikation *in vivo* gemessen. Dafür wurde die zwei Wochen in Schüttelkultur gewachsene CPK21-StrepII überexprimierende *A. thaliana* Linie 1.5.9 und die CPK21 D204A-StrepII überexprimierende Linie 1.5.1 mit 100 mM NaCl behandelt und Proben nach 10 und 30 Minuten genommen. Die Aktivität von CPK21 wurde zuerst mittels In Gel Kinasetest nach Romeis et al.(2001) getestet. Jedoch zeigte das Enzym nach diesen Protokoll keine Aktivität.

Aus diesem Grund wurde ein Kinasetest mit Syntide 2 als Substrat durchgeführt. Für jede Aufreinigung wurde die gleiche Menge Pflanzenmaterial verwendet und das aufgereinigte Enzym wurde im Western Blot detektiert. Es konnte beobachtet werden, dass CPK21-StrepII in *A. thaliana* sehr viel weniger exprimiert wurde, als in *N. benthamiana*. Während 0,5 g *N. benthamiana* Blattmaterial ausreichen, um genügend CPK21-StrepII für ein gut mit dem Piko ECL Kit (Supersignal® West Piko Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, USA) detektierbares Signal aufzureinigen, mussten 5 g *A. thaliana* für eine Detektion mit dem Femto ECL-Kit (Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, USA) eingesetzt werden. Auch konnte wie in *N. benthamiana* beobachtet werden, dass quantitativ mehr kinase-inaktives Enzym, als aktives Enzym exprimiert wird. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression aktiver CDPKs das biochemische Gleichgewicht in der Zelle stört und das Enzym degradiert wird.

Anschließend wurde mit dem aufgereinigten Enzym ein Kinasetest unter Standardbedingungen mit Syntide 2 als Substrat durchgeführt.

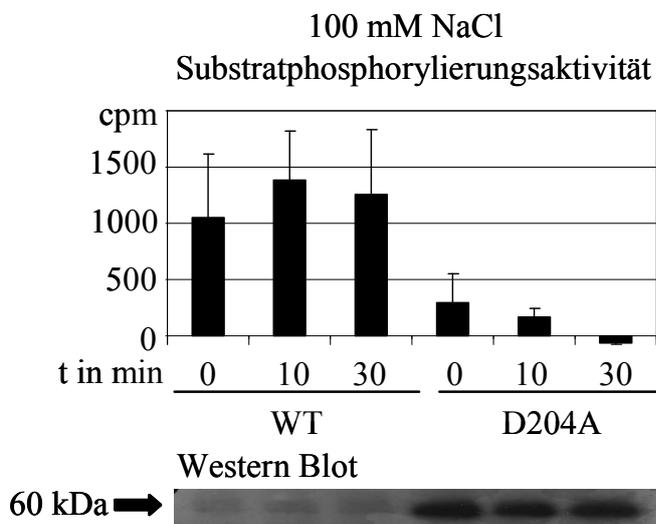


Abbildung 3.30: *In vivo* Aktivität von CPK21-StrepII (WT) und CPK21 D204A-StrepII (D204A) vor und nach Applikation von 100 mM NaCl. Die Enzyme wurden aus *A. thaliana* aufgereinigt. Proben wurden nach 0, 10 und 30 Minuten Salzstress gewonnen. Der Kinasetest erfolgte unter Standardbedingungen mit Syntide 2 als Substrat. Dargestellt ist die Substratphosphorylierungsaktivität nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (EGTA-Kontrolle).

Abbildung 3.30 stellt die *in vivo* Kinaseaktivität von CPK21-StrepII vor und nach Applikation von 100 mM NaCl zu CPK21-StrepII exprimierenden *A. thaliana* nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (EGTA-Kontrolle) dar. Es konnte eine 40 %ige Aktivitätssteigerung 10 Minuten nach Stressapplikation detektiert werden. 30 Minuten nach Stressapplikation fiel das Aktivitätsniveau von CPK21 wieder leicht. Dieser Test wurde zwei mal wiederholt mit vergleichbaren Ergebnissen.

3.9.3 *In vivo* Aktivität von CPK21 nach hyperosmotischem, hypoosmotischem Stress und mechanischem Stress

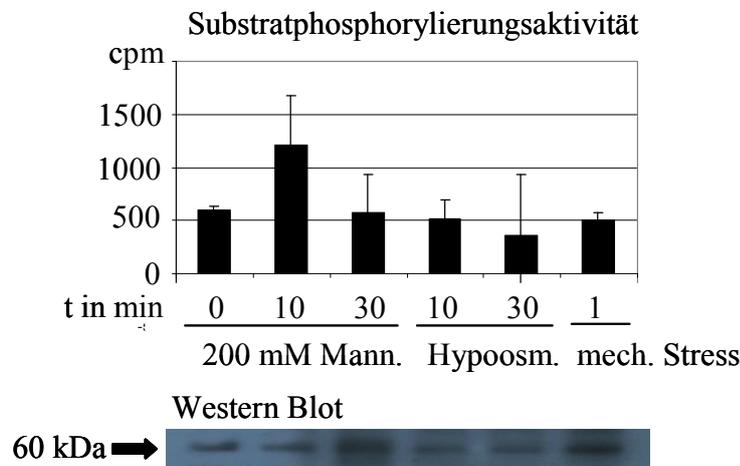


Abbildung 3.31: *In vivo* Aktivität von CPK21-StrepII (WT) vor und nach Applikation von 200 mM Mannitol (hyperosmotischer Stress), 2 Volumen destilliertem Wasser (hypo-osmotischer Stress) oder nach 1 minütigem mechanischem Stress. Die Enzyme wurden aus *A. thaliana* aufgereinigt. Proben wurden nach 0, 10 und 30 Minuten gewonnen. Der Kinasetest erfolgte unter Standardbedingungen mit Syntide 2 als Substrat. Dargestellt ist die Substratphosphorylierungsaktivität nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (EGTA-Kontrolle).

Abbildung 3.31 stellt die *in vivo* Kinaseaktivität von CPK21-StrepII vor und nach Applikation von 200 mM Mannitol (hyperosmotischer Stress), 2 Volumen destilliertem Wasser (hypo-osmotischer Stress) oder nach 1 minütigem mechanischem Stress aus CPK21-StrepII exprimierenden *A. thaliana* nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (EGTA-Kontrolle) dar. Nach Applikation von 200 mM Mannitol konnte eine 100 %ige Aktivitätssteigerung 10 Minuten nach Stressapplikation detektiert werden. 30 Minuten nach Stressapplikation fiel das Aktivitätsniveau von CPK21 wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Im Gegensatz dazu steigerte hypoosmotischer Stress nicht die Aktivität von CPK21.

Um zu überprüfen, ob das schnelle Trocknen der Pflanzen, durch Drücken auf saugfähigem Papier vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff die Aktivität von CPK21 beeinflusst, wurden die Pflanzen eine Minute mechanisch behandelt. Abbildung 3.31 zeigt, dass dies keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hatte.

Die hier dargestellten Tests wurden zwei mal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.9.4 *In vivo* Aktivität von CPK21 nach ABA-Applikation

ABA spielt eine Rolle in der Signaltransduktion von Salz- und hyperosmotischem Stress. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Transkription von *CPK21* und *CPK23* nach Applikation von 50 μ M ABA induziert wurde. Nun sollte untersucht werden, ob ABA die biochemische Aktivität von CPK21 beeinflusst. Dafür wurden 50 μ M ABA zu *A. thaliana* Protoplasten, die CPK21-StrepII unter Kontrolle des 35S-Promoters exprimierten, appliziert.

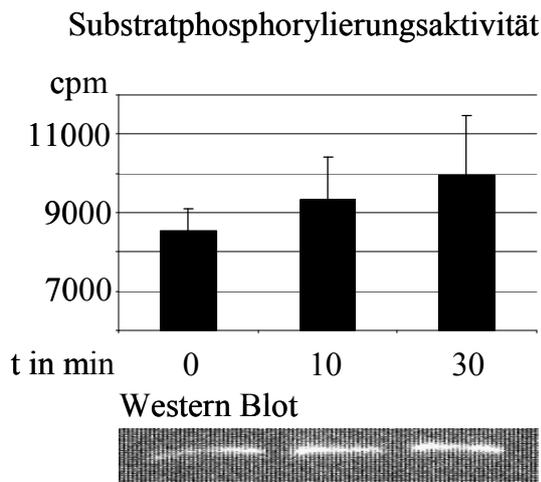


Abbildung 3.32: *In vivo* Aktivität von CPK21-StrepII (WT) vor und nach Applikation von 50 μ M ABA. Das Enzym wurde aus *A. thaliana* Protoplasten aufgereinigt. Proben wurden nach 0, 10 und 30 Minuten gewonnen. Der Kinasetest erfolgte unter Standardbedingungen mit Syntide 2 als Substrat. Dargestellt ist die Substratphosphorylierungsaktivität nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (EGTA-Kontrolle).

Abbildung 3.32 stellt die *in vivo* Kinaseaktivität von CPK21-StrepII nach Applikation von 50 μ M ABA zu CPK21-StrepII exprimierenden *A. thaliana* Protoplasten nach Subtraktion der Hintergrundaktivität (EGTA-Kontrolle) dar. Die Aktivität von CPK21 stieg nach ABA-Applikation kontinuierlich an.

Die höchste Enzymaktivität wurde 30 Minuten nach ABA-Applikation gemessen. Dieses Experiment wurde zwei mal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. Es ist kaum wahrscheinlich, dass die Aktivitätssteigerung auf einem pH-Wert-Effekt durch Zugabe von ABA beruht, da der pH Wert nur minimal von 5,601 auf 5,61 verschoben wurde.

3.10 Crosstalk mit MPKs

Aus der Literatur ist bekannt, dass AtMPK3, AtMPK4 und AtMPK6 durch Salzstress aktiviert werden (Mizoguchi et al., 1996; Ichimura et al., 2000). Um zu untersuchen, ob die Signaltransduktionswege, die CPK21 und eventuell CPK23 nach Salz- und osmotischem Stress aktivieren, mit denen überlappen, die AtMPK3, AtMPK4 und AtMPK6 aktivieren, wurde ein TEY-Western-Blot durchgeführt. Für diesen Western-Blot wird ein Antikörper

verwendet, der phosphorylierte und damit aktivierte AtMPK3, AtMPK4 und AtMPK6 erkennt.

Dafür wurden die *A. thaliana* Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 zwei Wochen in Schüttelkultur in 1/2 MS Medium mit 1 % Saccharose wachsen gelassen und anschließend 100 mM NaCl appliziert. Nach 0 min, 10 min und 30 min wurden Proben genommen und ein Proteinrohextrakt aus jeder Probe gewonnen. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Methode wurden gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel geladen und gelelektrophoretisch getrennt. Als Positivkontrolle für die MPK-Aktivierung wurde Flagellin 22 in Col-0 infiltriert und eine Probe nach 10 min genommen.

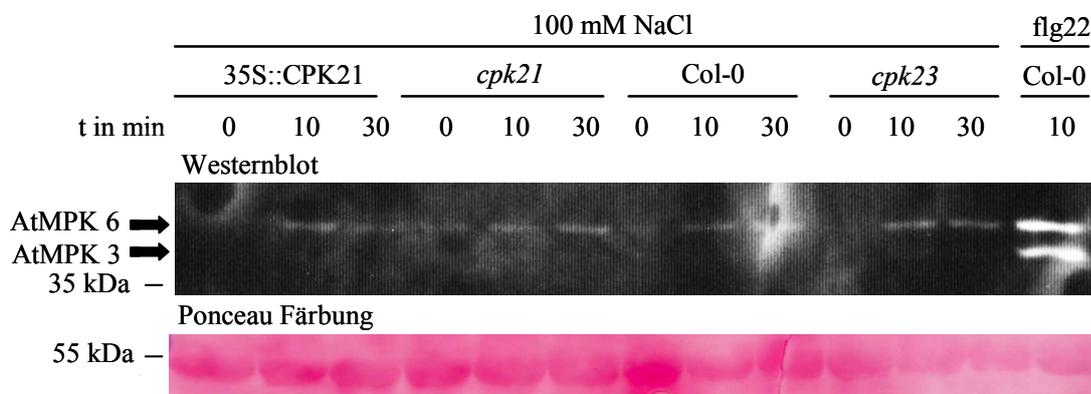


Abbildung 3.33: TEY Western zur Detektion phosphorylierter MAP-Kinasen nach Applikation von 100 mM NaCl zu 2 Wochen alten, hydroponisch gewachsenen *A. thaliana* Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9. Die Ponceau-Färbung zeigt gleiche Proteinmengen in allen Spuren an.

Abbildung 3.33 zeigt den TEY-Western und die Ponceau-Färbung, mit der die Gleichbeladung des SDS-Gels überprüft wurde. Phosphorylierte AtMPK3 und AtMPK6 konnten 10 bzw. 30 Minuten nach Applikation von 100 mM NaCl in den untersuchten Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 detektiert werden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Aktivierungsintensität im Vergleich zwischen den Linien. Dies deutet darauf hin, dass CPK21 und CPK23 in der Salzstress-Signaltransduktion AtMPK3 und AtMPK6 nicht vorgeschaltet sind.

4 Diskussion

Hohe Salzkonzentrationen auf agrarwirtschaftlich genutzten Flächen stellen ein großes Problem für die Landwirtschaft dar, da die meisten agrarwirtschaftlich genutzten Pflanzen über keine hohe Salztoleranz verfügen und es jährlich zu hohen Ernteausfällen kommt. Aus diesem Grund ist die Erforschung pflanzlicher Reaktionen und Toleranzmechanismen gegenüber Salzstress von besonderer Wichtigkeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von CPK21 und CPK23 aus *Arabidopsis thaliana* in der Signaltransduktion des abiotischen Stressfaktors Salz untersucht werden. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bietet auf Grund des vollständig sequenzierten Genoms und vielfältiger Vordaten anderer Arbeitsgruppen über Genexpressionsregulation sowie Transport- und Toleranzmechanismen nach Salzstress große Vorteile zur weiteren Untersuchung komplexer Stress-Antworten, bei der hormonale und externe Signale mit dem Wachstum und der Entwicklung der Pflanze über unterschiedlichste Signaltransduktionswege verknüpft werden. *Arabidopsis thaliana* ist ein Glycophyt, der sensitiv auf moderate Salzkonzentrationen reagiert. Die beiden CDPKs *CPK21* und *CPK23* wurden als Kandidatengene für die Salzstressantwort auf Grund von Vordaten von Dr. Joachim Kurth ausgewählt.

4.1 Phänotypische Charakterisierung der *cpk21* (SALK_029412) und *cpk23* (SALK_007958) T-DNA Insertionslinien

Zur Untersuchung der biologischen Funktion von Proteinen werden standardmäßig Insertionsmutanten in einem oder mehreren Genen aus *A. thaliana* auf phänotypische Unterschiede zum Wildtyp untersucht. Dieser Ansatz gestaltet sich im Falle einer Genfamilie wie den CDPKs (mit 34 Mitgliedern in *A. thaliana*) als sehr schwierig, da davon ausgegangen werden kann, dass funktionelle Redundanzen auftreten. Das heißt, beim Verlust eines Gens wird die Funktion des von ihm kodierten Proteins von einem Homologen übernommen. Oder aber andere Signalwege kompensieren die ausgefallene Proteinkinaseaktivität, was als Kompensation oder Adaption bezeichnet wird. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass Genfunktionsverlust-Phänotypen erst für 5 CDPKs beschrieben werden konnten. T-DNA-Insertionslinien der in Schließzellen exprimierten CDPKs CPK3 und CPK6 aus *Arabidopsis thaliana* zeigten eine Beeinträchtigung der ABA- und Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von „slow-type“ Anionenkanälen und der ABA-abhängigen Aktivierung Plasmamembranständiger Ca^{2+} -Kanäle. Auch die ABA- und Ca^{2+} -induzierte Stomataschließung wurde

beeinträchtigt (Mori et al., 2006). T-DNA-Insertionslinien der Arabidopsis CDPKs *CPK4* und *CPK11*, sowie Doppel-Insertionsmutanten in diesen beiden Genen zeigten eine erhöhte Trocken- und Salzstresssensitivität gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen (Zhu et al., 2007). Für *cpk23* SALK_007958 wurde eine erhöhte Trocken- und Salzstressresistenz beobachtet (Ma und Wu, 2007).

In dieser Arbeit wurde die biologische Funktion der beiden am nächsten verwandten CDPKs *CPK21* und *CPK23* aus *Arabidopsis thaliana* unter anderem mittels phänotypischer Charakterisierung zweier T-DNA Insertionslinien für diese Gene untersucht. Bei der homozygoten *cpk21* Insertionslinie SALK_029412 konnte mittels RT-PCR ein vollständiger Verlust von *CPK21*-Transkript gezeigt werden. Im Gegensatz dazu, konnte für die *cpk23* Linie SALK_007958 mit Primern die vor, beziehungsweise hinter der Insertion binden, *CPK23* Transkript detektiert werden (siehe Abbildung 3.3). Da jedoch kein Fragment mit Primern, die die Insertion flankieren, amplifiziert wurde, wird davon ausgegangen, dass ein funktionsloses „Sinnlos-Transkript“ entsteht. Ob dennoch eine *CPK23* Proteinvariante translatiert wird, konnte nicht überprüft werden, da keine *CPK23*-spezifischen Antikörper zur Verfügung standen. Da sich die T-DNA-Insertion in der *cpk23* Linie SALK_007958 im siebten und damit letzten Intron befindet und damit noch hinter dem Teil des Genes, der für die calciumbindenden EF-Hände codiert, wäre es denkbar, dass eine Enzymvariante mit allen funktionalen EF-Händen, aber ohne korrekten C-Terminus gebildet wird.

4.1.1 Phänotypische Charakterisierung adulter, auf Erde gewachsener Pflanzen

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden jeweils 78, 3 Wochen alte, auf Erde gewachsene Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und der *CPK21* Überexpressionslinie 35S::*CPK21*-StrepII 1.5.9 mit 300 mM NaCl behandelt. Es zeigte sich eine erhöhte Toleranz gegenüber Salzstress für die Linien *cpk21* und *cpk23*, mit einer schwach signifikant geringeren Chlorosenbildung (*P=0,0265) von *cpk23*. Die *CPK21* Überexpressionslinie (im *cpk21* Hintergrund) komplementierte den Mutantenphänotyp, was bestätigt, dass der beobachtete Effekt auf dem Verlust der *CPK21* Genaktivität beruht (siehe Abbildung 3.5).

Ma und Wu (2007) beschrieben bereits eine erhöhte Salz- und Trockenstressresistenz für die, auch in der vorliegenden Arbeit verwendete, *cpk23* Linie SALK_007958. Dafür behandelten sie vier Wochen alte Pflanzen (Col-0, *cpk23* und eine 35S::*CPK23* Überexpressionslinie) mit steigenden Salzkonzentrationen, beginnend bei 50 mM bis 200 mM. In der vorliegenden Arbeit konnte die erhöhte Salztoleranz der Linie *cpk23* verglichen mit Col-0 bestätigt werden.

Jedoch wurde eine andere Salzbehandlung gewählt, da mit steigenden Salzkonzentrationen kein unterschiedliches Verhalten zwischen Col-0 und *cpk23* sowie *cpk21* beobachtet werden konnte. Dies kann an unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (z.B. Luftfeuchtigkeit, Lichtintensität und –qualität, verschiedene Sorten Erde) liegen, die einen großen Einfluss auf die Entwicklung und Stressantwort der Pflanze haben.

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Toleranz gegen NaCl auf einer verbesserten Toleranz gegen die cytotoxische - oder die osmotische Wirkung des Salzes beruht, wurden 3 Wochen alte Pflanzen der selben Linien mit 200 mM Mannitol beziehungsweise 30 mM LiCl behandelt. Nach LiCl Behandlung konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen den einzelnen Linien beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede zwischen den Linien nicht auf einer verbesserten Toleranz der T-DNA-Insertionslinien gegenüber der cytotoxischen Komponente des Salzstresses beruhen.

Dies konnte für die Linie *cpk23* durch die Behandlung mit 200 mM Mannitol bestätigt werden. Sechs Tage nach der ersten Applikation von 200 mM Mannitol konnte, neben nachlassendem Turgordruck in den Blättern aller Linien, eine signifikant schwächere Ausbildung (*P = 0,046) stressbedingter Chlorosen von *cpk23* beobachtet werden, verglichen mit Col-0. Für *cpk21* konnte nur ein leichter phänotypischer Unterschied zu Col-0 unter hyperosmolaren Bedingungen festgestellt werden (siehe Abbildung 3.6). Auch der salztolerante Phänotyp der *cpk21* T-DNA-Insertionslinie war schwächer ausgeprägt als in der Linie *cpk23*. Allerdings ist bei diesem Experiment zu bedenken, dass ein plötzlicher starker Anstieg von Salzkonzentrationen im Boden unter natürlichen Bedingungen kaum vorkommen wird und es sich hierbei um ein „künstliches Laborszenario“ handelt.

4.1.2 Langzeitstressadaption nach Wachstum auf 1 MS-Medium

Um zu untersuchen ob CPK21 und/oder CPK23 an der langfristigen Salzstress-Adaption beteiligt sind und ein Verlust der Genfunktionen zu einer verbesserten langfristigen Toleranz gegenüber Salz- bzw. hyperosmotischem Stress führt, wurden Wachstumstests auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 300 mM Mannitol oder 100 mM NaCl durchgeführt (siehe Abbildung 3.4). Dieses Medium ist besonders geeignet, die Antwort auf die hyperosmotische Wirkung des Salzstresses zu untersuchen, da die MS-Salze und die Saccharose die osmotische Stärke des Mediums erhöhen, ohne zu einer vermehrten Ionentoxizität zu führen (Koiwa et al., 2006). Für die Wachstumstests wurden 4 Tage alte Keimlinge der Linien Col-0, *cpk21* und *cpk23* auf NaCl- bzw. Mannitol-haltiges Medium in Petrischalen umgesetzt und die

Entwicklung der Pflanzen beobachtet. Nach vierwöchigem Wachstum auf Mannitol-haltigem Medium zeigte sich eine verminderte Chlorosenbildung der beiden T-DNA Insertionslinien verglichen mit Col-0. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die erhöhte Toleranz von *cpk21* und *cpk23* gegenüber NaCl auf einer besseren Toleranz der osmotischen Wirkung des Salzes beruht.

Pflanzen auf NaCl-haltigem Medium zeigten im Vergleich zu Pflanzen auf stressfreiem Medium eine Verlangsamung der Entwicklung, allerdings ohne Chlorosenbildung. Die Pflanzen konnten sogar ihren Lebenszyklus bis zur Blütenbildung vollenden. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den Linien in der Entwicklung beobachtet werden. Sickler et al. (2007) zeigten, dass *Arabidopsis* unter Bedingungen mit hoher Transpiration und kontinuierlicher Exposition mit 100 mM NaCl nicht in der Lage ist, den Lebenszyklus zu vollenden. Dies deutet darauf hin, dass die Pflanzen während des Wachstums in den Petrischalen über eine sehr geringe Transpirationsrate verfügten und der Salztransport in die grünen Gewebe reduziert war. Damit ist die cytotoxische Wirkung des Salzes auf die Pflanze zu gering und 100 mM NaCl hat im Vergleich zu 300 mM Mannitol eine zu niedrige hyperosmolare Wirkung, um eine phänotypische Unterscheidung der Linien zu ermöglichen. Im auf Erde durchgeführten Vergleichsexperiment wiesen die Pflanzen einen höheren Salzgehalt in den grünen Geweben auf, so dass in diesem Experiment eine phänotypische Unterscheidung zwischen den Linien möglich war.

Alle Ergebnisse der Wachstumstests deuten darauf hin, dass CPK21 und CPK23 negative Regulatoren der Antwort auf Salz- und hyperosmotischen Stress sind.

4.1.3 Keimungstests

Im Gegensatz zu den durchgeführten Wachstumstests zeigte *cpk23*, aber nicht *cpk21* eine verzögerte Keimung an den ersten beiden Tagen auf 1/2 MS Medium mit 100 mM NaCl, 200/300 mM Mannitol bzw. 10 mM LiCl im Vergleich zu Col-0 (siehe Abbildung 3.7). Auch Zhu et al. (2007) beschrieben für *Atcpk4* und *Atcpk11* Einfach- und Doppel-Insertionslinien sich widersprechende Keimungs- und Wachstumsphänotypen. Die Insertionsmutanten zeigten eine Salz- und ABA-insensitive Keimung, im Gegensatz dazu aber eine erhöhte Salzsensitivität, wenn 4 Tage alte Keimlinge auf NaCl haltiges Medium umgesetzt wurden. Mano und Takeda (1997) zeigten, dass keine Korrelation zwischen der Salztoleranz während der Keimung und dem Keimlingsstadium in Gerste besteht und dass Salztoleranz in verschiedenen Entwicklungsstadien von unterschiedlichen genetischen Mechanismen

kontrolliert wird. Quesada et al. (2002) verglichen die Keimungsrate von 250 Arabidopsis Ökotypen und berichteten, dass die Ökotypen mit der höchsten Salztoleranz während der Keimung, am sensitivsten während dem Wachstum auf Salz reagierten. Dies deutet darauf hin, dass Gene unterschiedliche Funktionen in verschiedene Entwicklungsstadien haben können, was wahrscheinlich auch für CPK23 der Fall ist.

4.2 Expression von CPK21, CPK23 und ausgewählter Stressmarkergene nach Salz- und hyperosmotischem Stress sowie ABA-Applikation

Aus publizierten Microarray Experimenten geht hervor, dass die Expression 8 % aller Gene durch Salzstress reguliert wird, wobei 70 % dieser Gene nicht durch Trockenheit beeinflusst werden (Bohnert, 2001). Auch für einige CDPKs konnte Transkriptanstieg nach Kälte-, Salz-, und Trockenstress nachgewiesen werden (Berberich und Kusano, 1997; Urao et al., 1994; Tähtiharju et al., 1997; Martin und Busconi, 2001; Botella et al., 1996; Saijo et al., 2000; Patharkar und Cushman, 2000).

Auf Grund des beobachteten Mutantenphänotyps der Linien *cpk21* und *cpk23* sollte bestimmt werden, ob die Genexpression von CPK21 und CPK23 durch die untersuchten abiotischen Stressfaktoren Salz und Hyperosmolarität sowie ABA Applikation beeinflusst werden und ob die Genexpression ausgewählter Stressmarkergene durch CPK21 und CPK23 reguliert wird.

4.2.1 Untersuchung der Genexpression nach Zugabe von 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol bzw. 50 µM ABA zu 2 Wochen alten Pflanzen

Zum einen wurde die Genexpression der beiden CDPK-Gene und der bekannten abiotischen Stressmarker *RD 29A*, *RD 29B*, *DREB 1a* und *Cor 15a* mittels RT-PCR über einen Zeitkurs von 0, 1, 3, 6, 10 und 24 Stunden nach Applikation von 100 mM NaCl, 200 mM Mannitol bzw. 50µM ABA in 2 Wochen alten, in Schüttelkultur mit 1/2 MS und 1 % Saccharose gewachsenen, Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21* und *cpk23* untersucht (siehe Abbildungen 3.13, 3.14, 3.15).

Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von CPK21, jedoch nicht von CPK23 nach Applikation von 100 mM NaCl mit einem Maximum bei 6 Stunden aktiviert wurde. Die Genaktivität von CPK21 und CPK23 wurde jedoch nicht durch osmotischen Stress beeinflusst. Auch die Expression der untersuchten Stressmarker *RD29 A*, *RD29 B* und *Cor 15a* verhielt sich in allen Linien nach Salz- und hyperosmotischem Stress gleich.

ABA ist als Hormon in der abiotischen Stressantwort beschrieben und wird vor allem mit dem Wasserstatus der Pflanze assoziiert (Verslues und Zhu, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *CPK21* und *CPK23* nach ABA-Applikation, mit einem Maximum nach 6 Stunden, aktiviert wurde. Da für keine der hier untersuchten abiotischen Stressbedingungen die Expression der Markergene *RD 29A*, *RD 29B*, *Cor 15a* und *DRB 1a* im Vergleich zu Col-0 für die Linien *cpk21* und *cpk23* verändert war, scheint eine Regulation der Markergene auf transkriptioneller Ebene durch CPK21 und CPK23 unwahrscheinlich.

Diese Daten deuten darauf hin, dass *CPK21* ABA-abhängig als Antwort auf Salzstress transkriptionell aktiviert wird, während die Expression von *CPK23* zwar ABA-abhängig, aber eventuell als Antwort auf andere abiotische Stressfaktoren als hohe Salzkonzentrationen aktiviert wird.

4.2.2 Untersuchung der Genexpression nach Langzeitstressadaption

Des Weiteren wurde die Expression von *CPK21* und *CPK23* sowie der Markergene *RD 29A*, *RD 29B*, *RD22*, *Cor 15a*, *DREB 1a*, *ABII*, *ABI2*, *ABA1*, *ABF1*, *ABF2*, *ABF4*, *GST6* und *P5CS1* nach vierwöchigem Wachstum auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl bzw. 300 mM Mannitol untersucht (siehe Abbildung 3.16). Zu diesem Zeitpunkt zeigten *cpk21* und *cpk23* im Vergleich zu Col-0 eine erhöhte Toleranz gegenüber 300 mM Mannitol, während im Wachstum unter Anwesenheit von 100 mM NaCl kein phänotypischer Unterschied zwischen den Linien sichtbar war. Damit sollte untersucht werden, ob CPK21 und/oder CPK23 die Genexpression von Faktoren beeinflussen, die an zellulären Toleranzmechanismen nach Langzeitadaption an Salz- und hyperosmotischem Stress beteiligt sind. Salzstress verursacht osmotischen -, cytotoxischen - und oxidativen Stress. Die ausgewählten Markergene spielen eine Rolle in der Antwort auf all diese Stresskomponenten.

Es zeigte sich, dass die Transkriptmenge von *CPK21* nach 4 wöchigem Salz- und hyperosmotischem Stress und die Transkriptmenge von *CPK23* nach 4 wöchigem hyperosmotischem Stress anstieg. Da auch die Transkriptmenge von *CPK21* und *CPK23* in den 35S-Überexpressionslinien nach Stressexposition anstieg, ist davon auszugehen, dass die Expression der beiden Gene, als Antwort auf Salz- bzw. hyperosmotischen Stress, vor allem posttranskriptional reguliert wird. Dies erklärt eventuell auch, die im Gegensatz von Ma und Wu (2007) mittels GUS-Färbung beobachtete Reduktion der Expression von *CPK23* 4 bzw. 12 Tage nach Salz- und hyperosmotischem Stress.

Die *RD* (responsive to dehydration) Gene kodieren neben den *ERD* (early responsive to dehydration), *KIN* (cold inducible), *COR* (cold regulated) und *RAB* (responsive to ABA) Genen für LEA (late-embryogenesis-abundant) Proteine in vegetativen Geweben, die für die Trockenresistenz der Pflanze unter abiotischen Stressfaktoren wie Trockenheit, hohen Salzkonzentrationen und Kälte verantwortlich sind (Shinozaki und Yamaguchi-Shinosaki, 2000; Zhu, 2002). Der Proteingehalt von LEA-Proteinen korreliert mit der Stresstoleranz in verschiedenen Pflanzenarten. Wahrscheinlich haben sie eine schützende Funktion gegenüber osmotischem Stress. Die Expression von LEA-Proteinen wird über *cis*-Elemente im Promoter reguliert. Die beiden wichtigsten *cis*-Elemente für die Genexpressionsregulation auf Grund von abiotischem Stress sind DRE/CRT (dehydration-responsive element/ C-repeat) und ABRE (ABA-responsive element).

Es ist bekannt, dass die Expression von *RD 29A* sowohl ABA-abhängig und -unabhängig und *RD 29B* nur ABA-abhängig aktiviert wird. Die Expression von *RD 29A* wird durch Trockenheit, Kälte und Salzstress aktiviert. Dabei bindet der Transkriptionsfaktor DREB1 im *RD 29A* Promoter an das „dehydration-responsive element“ (DRE), welches jedoch nicht als ABA-responsives Element (ABRE) fungiert. Der Promoter von *RD 29B* verfügt über kein DRE-Element. Jedoch enthält es zwei ABRE-Elemente, die für die ABA-abhängige Expression des Gens essentiell sind (Uno et al., 2000). Die Funktion der von *RD 29A* und *RD 29B* kodierten Proteine ist nicht bekannt, jedoch wird angenommen, dass sie positive Regulatoren der Salzstresstoleranz sind. Die beiden Transkriptionsfaktoren ABI3 und ABI5, die in *Arabidopsis* Samen und Embryos exprimiert werden, sind wichtig für die Expression von *RD 29B* in Samen. ABI3, ABI5 und AREB1 aktivierten die Transkription des GUS Reportergens unter Kontrolle des *RD 29B* Promoters stärker, als GUS unter Kontrolle des *RD 29A* Promoters (Nakashima et al., 2006). Zhu et al. (2007) zeigten, dass die ABA-abhängige Expression von *RD 29A* und anderen (nicht in der vorliegenden Arbeit untersuchten) Stressmarkergenen in zwei Trockenstress-sensitiveren T-DNA Insertionslinien von *AtCPK4* und *AtCPK11* reduziert wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine Hinweise auf eine Funktion von CPK21 und CPK23 in der Regulation der Expression der für LEA-Proteine kodierenden Gene *RD 29A*, *RD 29B*, *RD22* und *COR 15a* sowie des Transkriptionsfaktors *DREB 1a*.

Die bZIP-Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2 (ABREB1), ABF3 und ABF4 (AREB2) binden ABRE-Motive in Promotoren und regulieren damit die ABA-abhängige Genaktivität. Ihre Expression wird durch Trockenheit, Salzstress und ABA aktiviert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beiden CDPKs CPK4 und CPK11 aus *Arabidopsis thaliana* ABF1

und ABF4 *in vitro* phosphorylierten und auch die Expression von ABF1 und ABF4 war in den Mutanten reduziert (Zhu et al., 2007). Auch für CPK32 aus *Arabidopsis thaliana* wurde mittels Yeast-Two-Hybrid-Tests gezeigt, dass es mit ABF4 interagiert und das Protein *in vitro* phosphoryliert (Choi et al., 2005). Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass CPK21 und CPK23 keinen Einfluss auf die Expression von *ABF1*, *ABF2* und *ABF4* haben.

Für die *P5CS* Gene wurde ebenfalls eine ABA-abhängige Aktivierung der Expression gezeigt (Xiong et al., 2001). Die von diesen Genen kodierten Proteine sind an der Prolin-Biosynthese beteiligt. Neben seiner Funktion als Osmolyt, aktiviert Prolin auch die Expression von salzstress-responsiven Genen mit Prolin-responsiven-Elementen (PRE) in ihren Promotoren (Satoh et al., 2002; Oono et al., 2003). Die Expression von *P5CS1* wird jedoch nicht von CPK21 und CPK23 reguliert

Die reduzierte Photosyntheserate auf Grund von Salzstress führt zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies führt zur vermehrten Bildung von Enzymen, die vor oxidativen Schäden schützen sollen. Mehr als 150 Proteine koordinieren das komplexe ROS-Netzwerk in *Arabidopsis* zur Gleichgewichtseinzustellung zwischen Bildung und Abbau von ROS (Mittler et al., 2004). Damit sollen oxidative Schäden verhindert, jedoch genügend hohen H_2O_2 Konzentrationen zur Auslösung von Signaltransduktionsprozessen erreicht werden. Unter diesen Enzymen finden sich unter anderem Superoxid-Dismutase und verschiedene Peroxidasen. Transgene Pflanzen, die Ascorbatperoxidase (Wang et al., 1999) und Gluthation S-Transferase/ Gluthation Peroxidase (Roxas et al., 1997 und 2000) überexprimieren, wiesen einer erhöhte Toleranz gegenüber osmotischem -, Temperatur- und oxidativem Stress auf. CPK21 und CPK23 regulieren die Expression von Gluthation S-Transferase 6 nicht.

Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass CPK21 und/oder CPK23 als Regulatoren zellulärer Toleranzmechanismen gegen Salz oder Hyperosmolarität wirken könnten. Um zu analysieren, ob Toleranzmechanismen konstitutiv aktiv in den beiden T-DNA-Insertionslinien sind und damit zu einem salztoleranteren Phänotyp führen, könnte die Genexpression weiterer abiotischer Stressmarkergene untersucht werden. Eventuell wirken CPK21 und/oder CPK23 nicht auf die Genexpression von Regulatoren der pflanzlichen Toleranzmechanismen, sondern modifizieren Proteinaktivitäten posttranslational über Proteinphosphorylierungen. Salzstressinduzierte Unterschiede im Phosphoproteom von Col-0 und *cpk21* und *cpk23* Pflanzen könnten mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender MS-Analyse der Proteine, die eine CPK21- oder CPK23-spezifische Phosphorylierung oder

Dephosphorylierung aufweisen, untersucht werden. Diese Methode wurde schon erfolgreich für AtCPK1 angewendet (Böhmer und Romeis, 2007).

Mittels GC-MS-Analyse könnte der Gehalt an ABA und Osmolyten wie Prolin, Polyolen, Zuckeralkoholen und Betainen in *cpk21* und *cpk23* verglichen mit Col-0 bestimmt werden, um die Frage zu klären, ob die ABA- und Osmolytbiosynthese in den Mutantenlinien dereguliert ist und damit zu einer verbesserten Toleranz gegenüber hyperosmotischem Stress führt.

Jedoch ist die Aktivierung der Expression von *CPK21* und *CPK23* nach Stressexposition überraschend, da die Mutantenphänotypen auf eine Funktion als negative Regulatoren der Salzstressantwort hindeuten. Dies deutet auf eine mögliche Funktion in der Regulation von Feedback-Mechanismen hin. Dies wurde auch für die beiden negativen Regulatoren der ABA-abhängigen Signaltransduktion und des ABA-Gehaltes *ABI1* und *ABI2* gezeigt, deren Expression durch ABA und osmotischen Stress induziert wird. Diese beiden Gene kodieren 2 homologe Typ 2C Protein-Phosphatasen, für die bereits gezeigt wurde, dass sie die ABA-abhängige Aktivierung von CPK10 und CPK30 aus *Arabidopsis thaliana* vermindern. (Leung et al., 1997; Verslues und Bray, 2006; Sheen, 1996). *ABI2* interagiert mit dem Protein-Phosphatase-Interaktions (PPI) Motiv von *SOS2*, was auf eine Funktion in der negativen Regulation von Salzstress deutet (Otha et al., 2003).

Die ähnlichen Mutantenphänotypen von *cpk21* und *cpk23* werfen die Frage auf, ob *CPK21* und *CPK23* im selben Signaltransduktionsweg von Salz- bzw. hyperosmotischem Stress involviert sind oder unterschiedliche Funktionen in der Stressantwort übernehmen. Diese Frage könnte die Untersuchung einer *cpk21 cpk23* Doppel-Genfunktionsverlust-Mutante klären. Zeigt eine phänotypische und molekulare Charakterisierung der Doppel-Mutante im Vergleich zu den Einzel-Mutanten einen stärkeren Phänotyp der Doppelmutante, wäre dies ein Hinweis auf verschiedene Signaltransduktionswege, in denen die beiden Gene eine Rolle spielen. Da beide Gene im Genom jedoch nur durch ein Gen getrennt voneinander liegen, ist eine Generierung dieser Doppel-Genfunktionsverlust-Mutante mittels Kreuzung sehr aufwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde ein RNAi sowie ein siRNA-Ansatz gewählt, um einen „Knock-Down“ von *CPK23* im *cpk21* Hintergrund zu erzeugen. Leider blieben diese Versuche ohne Erfolg.

Für *SOS2* und *SOS3*, welche für eine Proteinkinase (CIPK24) und das Calciumbindeprotein CBL4 codieren, wurde dieser Ansatz schon erfolgreich angewendet. *SOS2* reguliert durch Phosphorylierung den Plasmamembran-lokalisiernten Na^+/H^+ -Antiporter *SOS1*, sowie den vakuolären Na^+/H^+ -Antiporter *NHX1* nach Bindung von calciumbeladenem *SOS3*. Die

Kinase SOS2 spielt dabei eine zentrale Rolle in der Gewährleistung eines niedrigen Natriumgehaltes im Cytosol der Zelle (Chinnusamy et al., 2005). Der Phänotyp der *sos2 sos3* Doppelmutante konnte nicht von dem ausgeprägteren Phänotyp der *sos2* Einzelmutante unterschieden werden. Dies zeigte, dass beide Gene Komponenten des selben Signaltransduktionswegs sind (Halfter et al., 2000).

4.3 Substratphosphorylierungsaktivität von CPK21 nach Stressapplikation

Es wird angenommen, dass CDPKs an der schnellen Signalweiterleitung, ausgelöst durch stressinduzierte Calciumoszillationen, beteiligt sind. Der beobachtete Stressphänotyp von *cpk21* sowie die aktivierte Genexpression nach Salzstress und ABA-Applikation lassen eine Funktion von CPK21 in der Salzstress-Antwort vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob unterschiedliche abiotische Stressfaktoren einen Einfluss auf die Enzymaktivität von CPK21 haben. Dafür wurden verschiedene experimentelle Ansätze angewandt.

In Blätter von *N. benthamiana*, die CPK21-StrepII transient exprimierten, wurde durch Infiltration von 100 mM NaCl Salzstress appliziert. Dabei konnte keine Aktivitätssteigerung des Enzyms detektiert werden (siehe Abbildung 3.29). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die übergeschalteten Signaltransduktionskomponenten zu Aktivierung von CPK21 in *N. benthamiana* fehlen.

Des Weiteren wurden 2 Wochen alte, hydroponisch angezogene transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die CPK21-StrepII unter Kontrolle des 35S-Promoters exprimierten verwendet, um die biochemische Aktivierung des Enzyms *in vivo* zu untersuchen. Dabei konnte eine 40 %ige Aktivierung von CPK21 nach Salzstress und eine 100 %ige Aktivitätssteigerung nach hyperosmotischem Stress detektiert werden. Die Enzymaktivität erreichte dabei nach 10 Minuten ihren Maximalwert und fiel 30 Minuten nach Stressapplikation wieder. Hypoosmotischer Stress und mechanischer Reiz haben keinen Einfluss auf die biochemische Aktivität von CPK21 (siehe Abbildungen 3.30 und 3.31).

Zur Untersuchung der biochemischen Aktivität von CPK21 nach ABA-Applikation wurden *A. thaliana* Protoplasten verwendet, die CPK21-StrepII transient exprimierten. Das Enzym zeigte eine kontinuierliche Aktivitätssteigerung um 40 % bis 30 Minuten nach ABA-Applikation (siehe Abbildung 3.32). Die länger andauernde Aktivierung von CPK21 nach ABA-Applikation, im Vergleich zu Salz- und Mannitolapplikation kann eventuell auf den unterschiedlichen angewendeten Methoden beruhen. Protoplasten zeigen die selben

physiologischen Reaktionen auf unterschiedlichste Signale wie ganze Pflanzen und dienten in mehreren Studien der Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen (Sheen, 2001; Yoo et al., 2008). Jedoch muss bedacht werden, dass die Zellwand, Plasmodesmata und Zell-Zell-Interaktionen zerstört sind.

Auch Zhu et al. (2007) verfolgten die Enzymaktivität von AtCPK4 und AtCPK11 nach ABA-Applikation über einen Zeitkurs. Sie konnten zeigen, dass ABA-Applikation die Enzyme biochemisch aktiviert, mit einer Maximalaktivität nach 60 Minuten. Für ACPK1 aus Weintraube wurde *in vivo* eine Aktivitätssteigerung nach externer Applikation von ABA mit einem Maximum bei 60 Minuten gezeigt (Yu et al., 2006). Es kann auf Grund fehlender Experimente leider keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Aktivitätsmaximum von CPK21 ebenfalls erst 60 Minuten nach ABA-Zugabe erreicht wird.

Für 3 weitere CDPKs wurde *in vivo* eine Aktivitätssteigerung nach Stress detektiert. Romeis et al. (2001) zeigten eine 250-fache Aktivitätssteigerung von NtCDPK2 nach Elicitierung mit IF(AvR9⁺). LeCDPK1 aus Tomate wurde 2,4-2,9 fach nach Verwundung aktiviert (Chico et al., 2002). Eine 47 kDa CDPK aus Reis wurde nach Kältestress aktiviert. (Li und Komatsu, 2000).

4.4 Crosstalk mit MAP Kinasen

Des weiteren sollte untersucht werden, ob CPK21 und CPK23 mit salzstressspezifischen MAPK-Signaltransduktionswegen interferieren. So ist zum Beispiel bekannt, dass Salzstress auch die MAP-Kinasen AtMPK3, AtMPK4 und AtMPK6 aktiviert (Mizoguchi et al., 1996; Ichimura et al., 2000). Im Februar 2008 konnte eine putative MAPK Kinase Kinase als Negativregulator der Salzstressantwort identifiziert werden. Eine T-DNA Insertionslinie des Gens zeigte eine erhöhte Salzstresstoleranz während der Keimung und im Wachstum (Gao und Xiang, 2008).

Es wäre denkbar, dass Salzstress eine MAP-Kinase Kaskade auslöst, die mit einem CPK21 und/oder CPK23 abhängigen Signalweg interagiert und die beiden Wege sich gegenseitig positiv oder negativ beeinflussen. In einem durchgeführten TEY-Western, mit dem phosphorylierte und damit aktivierte MAP-Kinasen detektiert werden, konnten jedoch keine Unterschiede in der Aktivierungskinetik von MPK3 und MPK6 nach Salzstress in den *cpk21* und *cpk23* T-DNA Insertionslinien verglichen mit Col-0 nach Salzstress beobachtet werden (siehe Abbildung 3.33). Dies deutet darauf hin, dass die Signaltransduktionswege von CPK21 und CPK23 nicht mit denen von MPK3 und MPK6 überlappen.

4.5 CPK21 Enzymaktivität in Abhängigkeit der Calciumbindefähigkeit und Autophosphorylierung

Durch Analyse des *Arabidopsis thaliana* Genoms wurden von Day et al. (2002) 250 EF-Hand enthaltende Proteine identifiziert, wobei drei von vier Klassen Calcium-bindender Enzyme EF-Hände enthalten. Die hohe Anzahl von Proteinen und Enzymen mit einer oder mehreren Calcium-bindenden EF-Händen verdeutlicht die fundamentale Rolle von Calcium in der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Auch die Enzymaktivität von CDPKs wird neben der (Auto-) Phosphorylierung durch Calciumbindung an 4 EF-Hand-Motive reguliert. Um den Einfluss der Calciumbindung auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden verschiedene Enzymvarianten generiert, in denen die Calciumbindung einzelner EF-Hände, sowie des C- oder N-terminalen EF-Hand Paars verhindert wurde.

Es ist bereits bekannt, dass die C- und N-terminale EF-Hände nicht identisch in ihren Calcium- und Peptidbindeeigenschaften sind. Anhand der Messung der Calciumbindeaffinitäten der EF-Hände der beiden CDPKs AtCPK1 aus *A. thaliana* und LeCPK1 aus Tomate konnte gezeigt werden, dass sich die 4 EF-Hand Motive in zwei Klassen aufspalten. Die C-terminalen EF-Hände verfügen dabei über eine signifikant höhere Calciumbindeaffinität, als die N-terminalen EF-Hände (Christodoulou et al., 2004; Rutschmann et al., 2002). Die *in vitro* gemessenen hohen Calciumbindeaffinitäten der C-terminalen EF-Hände deuten darauf hin, dass *in vivo* schon bei basalen cytosolischen Calciumionen-Konzentrationen Calcium konstitutiv an die C-terminalen EF-Hände gebunden ist und erst nach Calciumeinstrom in das Cytosol die N-terminalen EF-Hände zu einer Calcium-Bindung fähig sind.

4.5.1 Hinweise auf die Calciumbindeaffinitäten der C- und N-terminalen EF-Hände

Die Calciumbindeaffinitäten der einzelnen EF-Hände von CPK21 und CPK23 wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt. Jedoch kann aus in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen der Mobilitätsveränderung der einzelnen CPK21 EF-Hand-Varianten in der SDS-PAGE nach Calciumbindung abgeleitet werden, dass auch die C-terminalen EF-Hände von CPK21 über eine höhere Calciumbindeaffinität verfügen, als die N-terminalen (siehe Abbildung 3.26).

Eine Mobilitätsveränderung in der SDS-PAGE nach Calciumbindung in der Anwesenheit von SDS im Ladepuffer wurde für einige Calciumbindeproteine wie CDPKs oder auch Calmodulin bereits beschrieben (Harmon et al., 1987; Burgess et al., 1980). Diese Mobilitätsveränderung beruht auf der Calciumbindung und damit ausgelöst

Konformationsänderung. Unter denaturierenden Bedingungen, wie sie durch SDS im Ladepuffer vorliegen, ist die Calciumbindung aber nur an Calciumbindestellen mit hoher Affinität möglich. Die CPK21 Enzymversionen mit Mutationen in den C-terminalen EF-Händen 3 und 4 zeigten keine Mobilitätsveränderung zwischen Calciumgebundener und -ungebundener Enzymform. Dies deutet darauf hin, dass die verbleibenden N-terminalen EF-Hände 1 und 2 unter den vorherrschenden denaturierenden Bedingungen, nicht zu einer Calciumbindung fähig sind. Im Gegensatz dazu zeigten die Enzymvarianten mit Mutationen in den N-terminalen EF-Händen 1 und 2 eine sehr deutliche Mobilitätsveränderung nach Calciumbindung, da die EF-Hände 3 und 4 mit hoher Calciumbindeaffinität noch funktionsfähig waren. Das Wildtypenzym zeigte das gleiche Verhalten wie die Variante EF 1 und 2, da es auch noch über die funktionalen affinen EF-Hände 3 und 4 verfügte.

Das Wildtypenzym sowie die verschiedenen EF-Hand Varianten von CPK23 zeigten unter den selben Bedingungen keine so deutliche Veränderung ihrer Mobilität in der SDS-PAGE nach Calciumbindung. Dies deutet auf niedrigere Calciumbindeaffinitäten der EF-Hände hin, so dass sie unter Anwesenheit von SDS nicht zur Calciumbindung fähig sind (siehe Abbildung 3.27).

4.5.2 Biochemische Aktivität der CPK21 EF-Hand Varianten

Des Weiteren kann aus den erhaltenen Aktivitätsdaten der EF-Hand Varianten von CPK21 eine Aussage darüber getroffen werden, welches EF-Hand Paar für die Aktivierung des Enzyms essentiell ist (Abbildung 3.24). Während die Enzymversionen mit den Mutationen in EF-Hand 3 oder EF 4 im Aktivitätstest mit Syntide 2 als Substrat mit der höchsten Calciumkonzentration [$5\mu\text{M}$] noch ca. 50 % der Wildtypaktivität besaßen, lag die Aktivität von den Enzymversionen EF 1 und EF 2 nur bei ca. 30 % Wildtypaktivität. Während die Enzymvariante mit Mutationen in den beiden EF-Händen 1 & 2 keine Enzymaktivität aufwies, zeigte die Mutation EF 3 & 4 noch Restaktivität bei hohen Calciumkonzentrationen. Auch zeigten sich Unterschiede in der Calciumkonzentrationsabhängigkeit der Aktivität zwischen den einzelnen Enzymversionen. Die CPK21 Varianten mit einer Mutation in EF 3 und EF 4 besaßen, ähnlich wie das Wildtypenzym, bei der niedrigsten Calciumkonzentration [$0,05\mu\text{M}$] schon ca. 80 % ihrer höchsten Aktivität bei der höchsten Calciumkonzentration [$5\mu\text{M CaCl}_2$]. Im Gegensatz dazu betrug die Aktivität von den EF 1 und EF 2 Mutanten bei $0,05\mu\text{M CaCl}_2$ nur ein Drittel ihrer Aktivität in der Gegenwart der höchsten Calciumkonzentration [$5\mu\text{M CaCl}_2$].

Dies deutet darauf hin, dass die C- und N-terminale EF-Hände unterschiedliche Funktionen bei der Aktivierung von CPK21 haben und die N-terminalen EF-Hände 1 und 2 als Calciumsensor für die Aktivierung dienen. Darauf deuteten auch die Untersuchungen der Calciumbindeaffinitäten der C- und N-terminalen EF-Hände sowie Röntgen-Kristall-Strukturstudien von AtCPK1 hin. Diese zeigten, dass schon bei niedrigen Calciumionenkonzentrationen die C-terminalen EF-Hände Calcium-gebunden vorliegen und die autoinhibitorische Junctiondomäne mit diesen EF-Händen interagiert. Erst ein stressinduzierter cytosolischer Calciumkonzentrationsanstieg führte zu Calciumbindung und Interaktion der N-terminalen EF-Hände mit der Junction-Domäne, welche zu der aktivierenden Konformationsänderung führte (Chandran et al., 2005; Christodoulou et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Bindung der Junctiondomäne die Calciumbindeaffinitäten des C-terminalen EF-Hand Motivs um den Faktor 100 erhöht (Christodoulou et al., 2004).

Zhao et al. (1994) untersuchten die Konformationsänderung und Aktivität von PfCPK des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* in Abhängigkeit der Calciumbindung an die einzelnen EF-Hände. Dafür wurden Versionen des Enzyms generiert, in denen die konservierte Aminosäure Glutamat an Position -X (Position 12) jeder EF-Hand gegen Lysin oder Glutamin ausgetauscht und damit die Calciumbindung verhindert wurde. Auch diese Studie zeigte, dass die N-terminalen EF-Hände 1 und 2 notwendig für die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung und die calciumabhängige Aktivierung sind, während Mutationen in den C-terminalen EF-Hand-Motiven 3 und 4 nur geringe Effekte zeigten. Die Enzymversionen mit Mutationen in EF-Hand 1 oder 2 zeigten im CD-Spektrum immer noch die charakteristische aktivierende Konformationsänderung nach Calciumbindung, jedoch wurde diese bei bedeutend höheren Calciumkonzentrationen ausgelöst, als im Wildtypenzym. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ähnlich wie in Calmodulin, die Calciumbindung kooperativ für das C- und N-terminale EF-Hand Paar erfolgt. Die Mutation in einer EF-Hand führt auch zu einer Reduzierung der Calciumbindeaffinität der zweiten EF-Hand in dem jeweiligen Paar.

Das Signal bei 222 nm des CD-Spektrums, welches die Gesamtkonformation des Enzyms widerspiegelt, zeigte keine Unterschiede der generierten mutierten Versionen zum Wildtypenzym von PfCPK. Dies zeigte, dass die eingefügten Mutationen an Position -X (Position 12) der EF-Hände keinen generellen Einfluss auf die Faltung des Enzyms haben (Zhao et al., 1994). Ob dies auch für den, in der vorliegenden Arbeit vorgenommen, Austausch des konservierten Aspartats an Position X und Y (Position 1 und 3) gegen Alanin

zutrifft, konnte nicht ermittelt werden. Nach transienter Expression *N. benthamiana* und anschließender Aufreinigung von CPK21 und CPK23 mittels StrepII-Markierung konnten alle Enzymvarianten in ähnlichen Mengen in Lösung detektiert werden, was nicht auf Faltungsprobleme hindeutet. Jedoch sind bei heterologer Expression der verschiedenen mutagenisierten Calciumbindedomänen von CPK21 in *E. coli* die Proteinmengen in der löslichen Fraktion abhängig von der exprimierten Version, was auf Faltungsprobleme mancher mutagenisierter Calciumbindedomänen nach Expression in *E. coli* hindeuten könnte (persönliche Kommunikation von Anja Liese).

Für CPK23 konnten leider keine experimentellen Bedingungen ermittelt werden, unter denen eine biochemische Aktivität von CPK23 mit Syntide 2 als artifiziellem Substrat gemessen werden konnte. Dabei wurden verschiedene Ca^{2+} - und Mg^{+} -Konzentrationen, pH-Werte und Substrate getestet.

4.5.3 Einfluss der Autophosphorylierung auf die biochemische Aktivität von CPK21

Die Autophosphorylierungsaktivität der Enzymversionen von CPK21 verhält sich analog zu ihren Transphosphorylierungsaktivitäten (siehe Abbildungen 3.24 und 3.25). Sie steigt mit steigenden Calciumkonzentrationen. Calciumabhängige Autophosphorylierung wurde bis jetzt für fast alle untersuchten CDPKs, mit Ausnahme zweier CDPKs aus „winged bean“ gezeigt. WbCDPK zeigt eine calciumunabhängige Autophosphorylierung (Saha und Singh, 1995), während WbPK keinerlei Autophosphorylierungsaktivität aufweist (Ganguly und Singh, 1998).

Das stärkste Autophosphorylierungssignal der untersuchten CPK21 Varianten im Kinasetest mit Syntide 2 oder Histon als Substrat wiesen das Wildtypenzym und die Varianten mit der Mutation in EF-Hand 3 oder 4 auf. Die Varianten mit Mutationen in EF-Hand 1 und 2 zeigten ein schwächeres Signal. Während die Doppelmutation in EF-Hand 3 und 4 noch über eine schwache Autophosphorylierung verfügte, zeigte die Version EF 1/2 kaum noch Autophosphorylierung. Dies deutet darauf hin, dass Calciumbindung an die N-terminalen EF-Hände 1 und 2 neben der Transphosphorylierungsaktivität auch für die Autophosphorylierung essentiell ist.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Autophosphorylierung CPK21 aktiviert und damit der funktionellen Regulation des Enzyms dient. Dafür wurde die Enzymaktivität mit und ohne ATP-Vorinkubation untersucht (siehe Abbildung 3.28). Es konnte eine Aktivitätssteigerung des Enzyms durch ATP-Vorinkubation gemessen werden. Der Unterschied der

Enzymaktivitäten zwischen vorinkubiertem und damit potentiell autophosphoryliertem Enzym und nicht autophosphoryliertem Enzym nahm über den Messzeitraum von 4 Minuten ab. Dies deutet auf eine schnelle Sättigung der Autophosphorylierungsreaktion hin, wie sie schon von Chauduri und DasGupta (1999) gezeigt wurde. So ist GnCDPK aus Erdnuss nach 2 Minuten vollständig autophosphoryliert. Auch für NtCDPK2 konnte eine *in vivo* Aktivierung des Enzyms durch Autophosphorylierung gezeigt werden (Romeis et al., 2001). Ein Autophosphorylierungssignal von CPK21 nach Auftrennung des Reaktionsansatzes in der SDS-PAGE konnte bei diesem Experiment nicht detektiert werden, da die Signalstärke auf Grund der kurzen Inkubationsdauer zu schwach war.

4.6 *In vivo* Funktion der Enzymvarianten von CPK21 und CPK23

Des Weiteren wurden die einzelnen EF-Hand Varianten von CPK21 und CPK23 auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Mutantenphänotyp zu komplementieren. Dafür wurden die beiden *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionslinien *cpk21* SALK_029412 und *cpk23* SALK_007958 mit dem Wildtypenzym, den EF-Hand Varianten, einer kinase-inaktiven Version sowie einer konstitutiv aktiven Variante des zerstörten Gens StrepII-markiert und unter Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Für CPK21 wurden auch Linien generiert, die das Wildtypenzym sowie die kinase-inaktive Variante unter Kontrolle des nativen Promotors exprimierten. Auf 1 MS Medium mit 3 % Saccharose und 300 mM Mannitol als osmotisch aktiver Substanz zeigten die CPK21 Enzymvarianten mit der höchsten Enzymaktivität das größte Vermögen, den Mutantenphänotyp zu komplementieren. Das heißt, sie waren sensitiver gegenüber hyperosmotischem Stress als die T-DNA Insertionslinie (siehe Abbildungen 3.10). Dabei konnten die Linien, die das Wildtypenzym unter transkriptioneller Kontrolle des 35S- sowie des nativen Promotors exprimierten, den Mutantenphänotyp vollständig komplementieren. Dies bestätigte, dass der Mutantenphänotyp auf dem Verlust der Genaktivität von *CPK21* zurückzuführen ist. Die Untersuchung der Transkriptmenge der exprimierten CPK21 Varianten verdeutlichte, dass die Menge an Transkript nicht verantwortlich für den beobachteten Phänotyp ist. So wiesen die Linien 35S::CPK21 EF1-StrepII 2.5.3, 35S::CPK21 EF1/2-StrepII 7.1.1 und 35S::CPK21 EF3/4-StrepII 4.1.3 ein geringes Komplementationsvermögen des Mutantenphänotyps auf, besaßen jedoch deutlich höhere CPK21-Transkriptmengen als Col-0 (siehe Abbildung 3.11).

Auch die verschiedenen CPK23 Enzymvarianten zeigten ein unterschiedliches Vermögen, den Wildtypphänotyp zu restaurieren, wobei die Menge an Transkript nicht mit dem Ausmaß

der Komplementation korreliert (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13). Damit kann davon ausgegangen werden, dass *cpk23* SALK_007958 ein funktionsloses Sinnlostranskript transkribiert.

Darauf, dass es sich bei dem beobachteten Toleranzphänotyp von *cpk21* um einen Genfunktionsverlust- und nicht um einen Kompensationsphänotyp handelt, bei dem die fehlende Genfunktion von *CPK21* von einem anderen Gen übernommen wird, deutet der identische Phänotyp von *cpk21* und der *cpk21* Linien, welche die kinase-inaktive Enzymvariante exprimierten. Darüber, ob dies auch für *cpk23* der Fall ist, kann nur spekuliert werden, da eine Linie, welche die kinase-inaktive Variante des Proteins exprimiert fehlt. Jedoch zeigten auch hier die Linien, welche die Enzymvarianten mit Mutationen im C-terminalen – bzw. N-terminalen EF-Hand-Paar exprimieren (diese Varianten zeigten für *CPK21* eine starke Reduktion der Aktivität im Kinasetest) den selben Toleranzphänotyp wie *cpk23*, was ebenfalls für einen Genfunktionsverlustphänotyp spricht. Um diese Frage befriedigend zu beantworten, könnte man mittels Microarrays untersuchen, ob die Transkription anderer Gene (z.B. CDPKs) durch den Verlust der *CPK21* und *CPK23* Genaktivität verändert wird und damit deren Verlust kompensieren könnten.

4.7 Putative Funktionen von CPK21 und CPK23 in der Salzstressantwort

Die phänotypischen Untersuchungen von *cpk21* und *cpk23* im Vergleich zu Col-0, die Aktivierung der Genexpression von *CPK21* nach ABA-Applikation, Salz- und hyperosmotischem Stress und die Transkriptakkumulation von *CPK23* nach ABA-Applikation und hyperosmotischem Stress sowie die biochemische *in vivo* Aktivierung von *CPK21* nach ABA-Applikation sowie Salz- und hyperosmotischem Stress identifizierten *CPK21* und *CPK23* als putative Regulatoren der Salzstressantwort in *A. thaliana*. In den nachfolgenden Kapiteln soll über eine mögliche Funktion der beiden Enzyme spekuliert werden.

4.7.1 Putative Funktionen von CPK21 und/oder CPK23 in der Regulation der Stomataöffnung

Ma und Wu (2007) beschrieben eine signifikant geringere Stomataöffnung der Linie *cpk23* verglichen mit Col-0, was eventuell zu der beobachteten Resistenz gegen Trocken- und hyperosmotischen Stress beiträgt. Hohe Salzkonzentrationen führen zu einer Reduzierung der Stomataöffnung, was auf den osmotischen Effekt des Salzes im Medium zurückzuführen ist.

Eine reduzierte Stomataöffnung in *cpk23* würde damit ebenfalls auf eine Rolle von CPK23 in der Toleranz gegenüber der hyperosmolaren Komponente des Salzstresses sprechen. Um zu untersuchen, ob eine verminderte Transpiration zu den in der vorliegenden Arbeit beobachteten salzstressresistenteren Mutantenphänotypen der Linien *cpk21* und *cpk23* beitragen könnte, wurde ein Blatttrocknungstest durchgeführt. Dafür wurde der Wasserverlust von abgeschnittenen Blättern von jeweils zehn, drei Wochen alten, auf Erde gewachsenen, Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 über einen Zeitraum von 4 Stunden gemessen (siehe Abbildung 3.6). Es konnten jedoch keine Unterschiede im Wasserverlust zwischen den Linien gemessen werden, was den Ergebnissen von Ma und Wu (2007) widerspricht.

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Promoter-GUS-Studien deuten nicht auf eine Expression von *CPK21* und *CPK23* in den Schließzellen hin, was eine Regulation der Stomataöffnung durch CPK21 und/oder CPK23 unwahrscheinlich erscheinen lässt (siehe Abbildungen 3.17 und 3.18). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die, für eine Expression in den Schließzellen nötigen regulatorischen Elemente, noch vor dem verwendeten Fragment liegen. Darauf deuten auch die Microarray-Untersuchungen von Leonhardt et al.(2004) hin, die neben *CPK3*, *6*, *30* und *33* auch *CPK23* Transkript in den Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* detektieren konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expression beider Gene in Keimlingen sowie adulten Pflanzen gefunden. *CPK21* Genaktivität wurde im Wurzel- und Blattleitgewebe detektiert, während *CPK23* in den Hydatoden exprimiert wurde. *CPK21* wird auch in der Blüte ausgewachsener Pflanzen in den Leitgeweben der Kelchblätter exprimiert. Allerdings zeigten Ma und Wu (2007) mittels GUS-Färbung eine stärkere Expression von *CPK23* in Blatt und auch in der Wurzel. Die Länge des in dieser Arbeit verwendeten Promoterfragments von *CPK23* betrug 1219 bp, während Ma und Wu (2007) ein 8,5 kb Fragment, einschließlich der kodierenden Sequenz des Genes verwendeten. Die Unterschiede der beobachteten Expression von *CPK23* können daraus resultieren, dass wichtige regulatorische Sequenzen des *CPK23* Promotors durch die Verwendung des kürzeren Promotorfragments nicht mit abgedeckt wurden. Auf <https://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp> sind Microarraydaten für fast alle *A. thaliana* Gene veröffentlicht. Für *CPK21* und/oder *CPK23* wird Transkript vor allem im Stielblatt angegeben, aber auf basalem Niveau auch in Wurzel, Blüte und Rosettenblättern. Auf Grund der hohen Sequenzhomologie der beiden Gene, kann bei diesen Daten nicht zwischen *CPK21* und *CPK23* Transkript unterschieden werden. Der Arabidopsis eFP-Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca>) zeigt eine insgesamt schwächere Expression von

CPK23 als *CPK21*, was in dieser Arbeit mittels RT-PCR bestätigt wurde. Während *CPK21* nach eFP-Browser-Daten in allen Geweben der Pflanze und dabei besonders in den Blättern exprimiert wird, ist *CPK23* Transkript hauptsächlich im Stielblatt und seneszenten Blättern, jedoch auch auf sehr niedrigem Niveau in Wurzel, Blüte und Rosettenblättern detektierbar (Siehe auch Abbildungen 5 und 6 im Anhang).

Auch eine Mutation im *GCA2*-Locus im *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* (Ler) deutet auf eine Funktion von *CPK23* in der Regulation von ABA-abhängigen Prozessen wie der Schließzellbewegung im *A. thaliana* Ökotyp *Columbia* hin. Der *GCA2*-Locus wurde auf dem oberen Arm des 4 ten Chromosoms lokalisiert (Benning, 1999) und konnte als Homolog von *CPK23* identifiziert werden (persönliche Kommunikation von Prof. Erwin Grill).

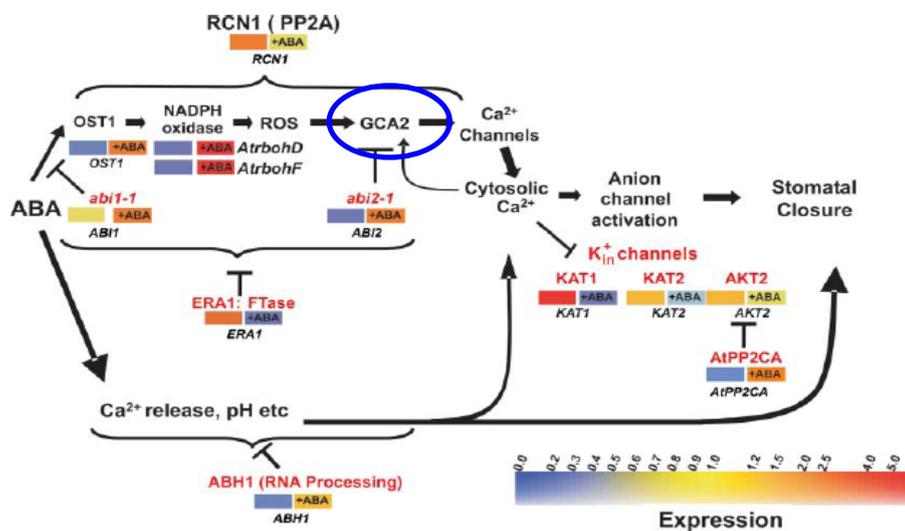


Abbildung 4.1: Modell der ABA-abhängigen Signaltransduktion in Schließzellen. Aus Leonhardt et al., 2004

Die *gca2* Mutante im Ler-Hintergrund zeigt einen pleiotropen ABA-insensitiven Phänotyp. Dieser zeichnet sich durch ABA-insensitives Primärwurzelwachstum und Samenkeimung, sowie einer Verhinderung der ABA-induzierten Stomataschließung aus. Damit ist *GCA2* als positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion in den Schließzellen beteiligt, der für die Regulation der ROS-, ABA- und CO₂-abhängigen Calciumkanal-Aktivierung zur Stomataschließung nötig ist (Young et al., 2006; Allen et al., 2001; Pei et al., 2000; siehe auch Abbildung 4.1).

Keine Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Funktion von AtCPK23 in der ABA-abhängigen Regulation der Stomata-Apertur hin. Auch eine ABA-insensitive Samenkeimung von *cpk23* wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Ma und Wu (2007) zeigten im Widerspruch zu den Daten über *gca2*, welche durch Inhibition der CO₂-induzierten Stomataschließung charakterisiert wurde (Young et al., 2006), eine geringere Stomata-Apertur in *cpk23* verglichen zu Col-0.

Eventuell reguliert CPK23 in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Columbia* und *Landsberg erecta* die Aktivität von Kalium- oder Calciumkanälen in den Schließzellen.

Auch für AtCPK1 konnte im heterologen Expressionssystem Hefe eine Funktion in der Regulation der Aktivität einer Calciumpumpe gezeigt werden. Die Phosphorylierung an der N-terminalen regulatorischen Domäne der Calmodulin-stimulierten Ca²⁺-Pumpe ACA2 im Endoplasmatischen Retikulum inhibiert die basale Aktivität und die Calmodulin-Stimulation von ACA2 (Hwang et al., 2000).

Kwak et al. (2003) zeigten, dass die ROS vermittelte Calciumkanal-Aktivierung in den Schließzellen abhängig von den NADPH-Oxidase Untereinheiten AtrbohD und AtrbohF ist. Diese beiden NADPH Oxidasen produzieren ROS, die Plasmamembran-ständige Calciumkanäle aktivieren. Ogasawara et al. (2008) zeigten zusätzlich, dass AtrbohD durch Calciumbindung und Phosphorylierung synergistisch aktiviert wird. Weitere Daten deuten darauf hin, dass die ROS vermittelte Calciumkanal-Aktivierung eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion in verschiedenen Geweben einnimmt und die ROS-Produktion gewebespezifisch von den 10 verschiedenen NADPH-Oxidase-Untereinheiten übernommen wird (Demidchik et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CPK21 zwei Peptide der NADPH-Oxidase-Untereinheit RbohD *in vitro* stärker phosphorylierte, als das artifizielle Peptidsubstrat Syntide 2, was auf eine Funktion in der ROS-Generierung, als Antwort auf Salzstress, hinweisen könnte. Jedoch zeigen bisher veröffentlichten Arbeiten eine hohe *in vitro* Substratpromiskuität von CDPKs, die keine Aussagen über die *in vivo* Substrate zulassen (Patharkar und Cushman, 2000; Rodriguez Milla et al., 2006; Sebastia et al., 2004). Um zu untersuchen, ob CPK21 und/oder CPK23 AtrbohD phosphorylieren, könnte man das Protein aus den *cpk21* und *cpk23* Mutantenlinien aufreinigen und dessen Phosphorylierungsstatus mit Col-0 vergleichen.

4.7.2 Putative Funktionen von CPK21 und CPK23 in der Regulation von Na⁺- und K⁺-Transportprozessen

Für viele Pflanzenfamilien wurde gefunden, dass Salz-tolerantere Arten die größere Fähigkeit besitzen, Natrium aus den oberirdischen Geweben auszuschließen und hohe cytosolische Kaliumkonzentrationen beizubehalten (Zhu et al., 2001; Munns et al., 2000; Dubcovsky et al., 1996). Der Ausschluss von Na⁺ aus den oberirdischen Geweben ist nötig, da hohe Na⁺-Konzentrationen unterschiedliche osmotische und metabolische Probleme verursachen. Die cytotoxische Wirkung von Na⁺ beruht auf der Fähigkeit der Ionen, mit K⁺ um die Bindung an Proteine und Enzyme zu konkurrieren. Mehr als 50 Enzyme sind bekannt, welche K⁺ als Cofaktoren benötigen und dessen Funktion Na⁺ nicht übernehmen kann (Bhandal und Malik, 1988). Des Weiteren werden für die Proteinbiosynthese hohe Kaliumkonzentrationen benötigt (Wyn Jones et al., 1979). Hohe Salzkonzentrationen verursachen auch ein osmotisches Problem. Um einen konstanten Turgordruck aufrecht zu erhalten und die Wasseraufnahme zu gewährleisten, muss das interne Wasserpotential unter dem Wasserpotential der Erde gehalten werden. Dafür müssen entweder energieaufwendig Osmolyte synthetisiert werden, oder Ionen (hauptsächlich die toxischen Ionen Na⁺ und Cl⁻) aus der Erde aufgenommen werden. Pflanzen müssen dabei eine Balance zwischen der Verhinderung toxischer Ionenkonzentrationen und der Aufrechterhaltung des Turgordrucks finden. Na⁺-Aufnahme und Transport müssen daher streng kontrolliert werden.

Ma und Wu (2007) zeigten, dass die Salzstress-assoziierte Reduzierung der Kaliumaufnahme in der Linie *cpk23* inhibiert war, was zu einem höheren cytosolischen K⁺/Na⁺-Verhältnis führen könnte. Dies deutet darauf hin, dass CPK23 die „high-affinity“ Kaliumaufnahme reguliert.

Diese Theorie wird durch die in der vorliegenden Arbeit ermittelte intrazelluläre Lokalisation von CPK21 und CPK23 unterstützt. Mittels transienter Expression der YFP-markierten CDPKs in *N. benthamiana* konnte eine intrazelluläre Lokalisation von CPK21 und CPK23 an der Plasmamembran, sowie nach transienter Expression in *A. thaliana* Protoplasten eine Tonoplast- und Plasmamembran-Lokalisation gezeigt werden (siehe Abbildungen 3.19 und 3.20). Die beobachtete Lokalisation im Tonoplast nach transienter Expression in *A. thaliana* Protoplasten ist eventuell auf eine „Überproduktion“ der Enzyme zurückzuführen, die zu einer „Fehllokalisation“ führen könnte. Auch Dammann et al. (2003) zeigten für CPK21 unter transkriptioneller Kontrolle des 35S-Promoters eine Lokalisation in der Plasmamembran von Wurzelspitzenzellen transgener *A. thaliana*. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Fluoreszenz-Signal von YFP-markierter CPK21 unter Kontrolle des 35S- Promoters sowie

des nativen Promoters in stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen detektiert werden, so dass auf die transiente Expression der CDPKs zurückgegriffen werden musste.

Die Membranlokalisation von CDPKs erfolgt durch Myristoylierung und eventuell S-Acylierung. Dies sind posttranslationale Modifikationen, wobei 24 der 34 CDPKs aus *A. thaliana* eine Myristoylierungsstelle aufweisen (Bucher und Bairoch, 1994). Auch CPK21 und CPK23 verfügen über die N-terminale MGXXX(S/T)-Myristoylierungssequenz. Ein Cystein (C3) C-terminal neben dem Glycin (G2) in der Myristoylierungssequenz könnte zusätzlich der S-Acylierung durch Palmitinsäure oder Stearinsäure dienen.

Für CBL1 wurde gezeigt, dass Myristoylierung und Acylierung unabhängig voneinander erfolgen, die Myristoylierung jedoch eine Voraussetzung für die Acylierung darstellt. Beide Modifikationen sind essentiell für die korrekte Lokalisation und Funktionalität von CBL1 und der interagierenden CIPK1 (Batistič et al., 2008).

Auch für NtCPDK2 aus *Nicotiana tabacum* wurde ein Zusammenhang zwischen korrekter Lokalisierung und Funktionalität gezeigt. Nach Mutagenese der Myristoylierungsstelle einer vk-Variante von NtCDPK2, , welche die Myristoylierung verhindert, zeigte diese nicht mehr die selbe Lokalisierung wie die nichtmutagenisierte vk-Variante und es wurde eine Verringerung von NtCDPK2-induziertem Zelltod nach transienter Expression in *N. benthamiana* beobachtet (Witte et al., unveröffentlicht).

Um zu untersuchen, ob die beobachtete verbesserte Salztoleranz der *cpk21*- und *cpk23*-Insertionslinien auf einer (a) reduzierten Aufnahme und damit reduzierten Konzentration von Na^+ -Ionen in den grünen Geweben oder (b) einer Verhinderung der salzstressassoziierten Reduktion der Kaliumaufnahme beruht und damit ein höheres cytosolisches K^+/Na^+ -Verhältnis erzielt wird, wurde der Na^+ - und K^+ -Gehalt in den grünen Geweben 3 Wochen alter, auf Erde gewachsener, Pflanzen der Linien Col-0, *cpk21*, *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 vor und nach 24 stündiger Exposition mit 100 mM NaCl mittels ICP-MS gemessen (siehe Abbildung 3.21).

Während Col-0 einen Anstieg der Na^+ -Konzentrationen nach 24 stündiger Exposition mit 100 mM NaCl in den grünen Geweben zeigte, wies *cpk23* weniger Na^+ -Ionen in den grünen Geweben auf. Für *cpk21* sowie 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 blieb die Natriumionenkonzentration nach Salzexposition konstant. Während der Kaliumgehalt in Col-0 und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 sank, blieb er in *cpk23* und *cpk21* konstant. Daraus resultierte ein höheres K^+/Na^+ -Verhältnis von *cpk23* verglichen mit Col-0 nach eintägiger Exposition mit 100 mM NaCl. *Cpk21* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 zeigten ein insgesamt höheres K^+/Na^+ -Verhältnis als Col-0, was sich durch die Salzexposition kaum verändert.

Auffällig war, dass die Natriumkonzentration in *cpk23* und 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 an Tag 0 deutlich über denen von Col-0 lag.

Die niedrigere Na^+ -Menge in den grünen Geweben von *cpk23* nach 24 stündiger Exposition mit 100 mM NaCl könnte einerseits damit erklärt werden, dass CPK23 entweder die Na^+ Aufnahme über nicht-selektive Kationenkanäle, den Na^+ -Efflux in der Wurzelepidermis oder den Na^+ -Transport aus der Wurzel ins Xylem, oder den Rücktransport aus dem Blatt in die Wurzel über das Phloem kontrolliert. Dies erscheint möglich, da CPK23 nach Daten von Ma und Wu (2007) und dem Arabidopsis eFP-Browser im Wurzelgewebe und in Leitgeweben der Blätter exprimiert wird, das Enzym Plasmamembran- und Tonoplast-lokalisiert vorliegt und die Aktivitätskontrolle von Transportern und -Kanälen durch Phosphorylierung schon demonstriert wurde (Chinnusamy et al, 2005; Xu et al., 2006). Auf die Sequestrierung von Na^+ in der Vakuole hat CPK23 wahrscheinlich keinen Einfluss. Bei einer verbesserten Sequestrierung von Na^+ in *cpk23* würde man höhere Na^+ -Konzentrationen nach Salzstress in den grünen Geweben erwarten. Die unveränderten Kaliumkonzentrationen in *cpk23* nach Salzexposition bestätigen die Ergebnisse von Ma und Wu (2007).

Cpk21 zeigte keine Veränderungen der Natrium- und Kaliumkonzentrationen nach Salzstress, was auf eine Deregulation von Na^+ - und K^+ -Aufnahmeprozessen hindeutet. Auch die Überexpression von CPK21 in 35S::CPK21-StrepII 1.5.9 führt anscheinend zu einer Deregulation von Transportprozessen. Dies liegt eventuell auch an der Expression des Gens in Geweben, in denen es unter natürlichen Bedingungen nicht aktiv ist. Während in *cpk21* der Natriumgehalt, dem in Col-0 entsprach und der Kaliumgehalt etwas unter dem von Col-0 lag, waren die Konzentrationen beider Ionen in der CPK21-Überexpressionslinie erhöht.

Abbildung 4.2 zeigt Na^+ -Transportmechanismen an deren Regulation CPK21 und/oder CPK23 beteiligt sein könnten.

Es gibt drei Wege, über die Na^+ aus dem Medium in die Wurzel gelangen kann. Diese sind (1) „Leakage“ in den Wurzelapoplasten, (2) Ca^{2+} -sensitiver Influx über nicht-selektive Kationenkanäle (NSCCs) aus den Familien der „cyclic nucleotid-gated channels“ (CNGCs) und der Glutamat-aktivierten Kanäle (GLRs), (3) Ca^{2+} -insensitiver Influx über nicht-selektive Kationenkanäle und Mitglieder der HAK/KT/KUP Familie (mit hoher Selektivität für Kalium, jedoch auch niedriger Natriumtransportaktivität), wobei Natrium hauptsächlich passiv in die Wurzel gelangt (Cheeseman, 1982).

Es wurden Mutanten mit geringerer AtHKT1-Aktivität gefunden, die den Salz-sensitiven *sos3* Phänotyp komplementierten, was auf Na^+ -Aufnahmetransportaktivität des Transporters hindeutet (Rus et al., 2001). Ebenfalls wird die Kontrolle von HKT1 und dessen Inaktivierung

unter Salzstress durch SOS3 diskutiert (Zhu, 2002). Jedoch wird die Natriumtransportaktivität von HKT1 durch moderate NaCl-Konzentrationen inhibiert, so dass dieser Kanal wahrscheinlich keine Rolle in der Salztoleranz spielt.

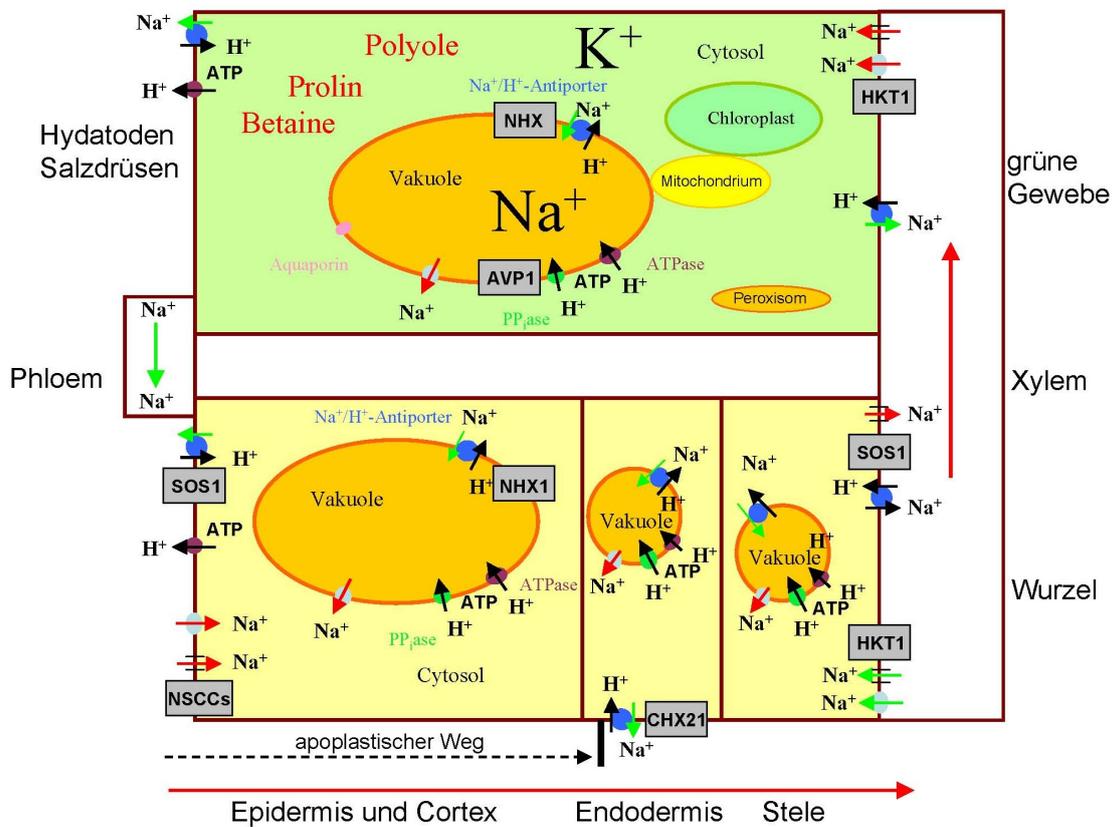


Abbildung 4.2: Natrium Transportprozesse, welche die Natriumtoleranz in höheren Pflanzen beeinflussen. Rote Pfeile stellen Natriumtransportprozesse dar, deren Minimierung die Toleranz erhöhen würde, grüne Pfeile stellen Natriumtransportprozesse dar, deren Maximierung die Toleranz erhöhen würde. Nach Tester und Davenport, 2003.

Die erhöhte Salztoleranz von Pflanzen auf Grund von Calcium im Medium, wurde schon 1961 entdeckt (Epstein 1961 und 1998). Dieser Schutzmechanismus beruht unter anderem auch auf einer selektiven Absorption von K^+ bei hohen Na^+ -Konzentrationen im Medium, wahrscheinlich durch die unter (2) beschriebenen Kanäle. Aber auch Salzstress-induzierte Calcium-abhängige Signaltransduktionswege kontrollieren die Aktivität von K^+ -Kanälen und damit Toleranzmechanismen.

Mittels vergleichender Wachstumstests von Col-0, *cpk21* und *cpk23* auf NaCl-haltigem Medium mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen könnte unterschieden werden, ob CPK21 und/oder CPK23 eventuell den Ca^{2+} -sensitiven oder -insensitiven Na^+ -Influx beeinflussen. Dabei muss aber für eine genügende Transpiration und damit Salztransport in die Pflanzen gesorgt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumstests auf 1 MS mit 3 % Saccharose und 100 mM NaCl zeigten keine phänotypischen Unterschiede zwischen

Col-0 und *cpk21* und *cpk23*, was wahrscheinlich an dem mangelnden Transport des Salzes in die grünen Gewebe durch reduzierte Transpiration liegt. Wie schon erläutert, gelangt Na^+ wahrscheinlich unspezifisch über NSCCs, deren physiologische Funktionen noch weitgehend unbekannt sind, in die Wurzel. Im *A. thaliana* Genom sind 20 Gene, die für NSCCs codieren annotiert (Demidchik et al., 2002), welche wahrscheinlich stark überlappende Funktionen haben. So konnten in einem Mutantenscreen, in dem 70.000 *gll* und *sos3-1* T-DNA-Linien untersucht wurden, um NSCCs zu identifizieren, die für die Natriumaufnahme verantwortlich sind, keine Mutanten identifiziert werden, die den Salz-hypersensitiven Phänotyp von *sos3-1* komplementieren (Hua et al., 2003). Dies lässt NSCCs als potentielle Substrate für CPK21 und/oder CPK23, deren Deregulation durch Fehlen der beiden CDPKs zu einem beobachtbaren Phänotyp führt, unwahrscheinlich erscheinen.

Auch eine Funktion in der Regulation des Na-Efflux aus der Wurzel zurück ins Medium ist denkbar. Wie gezeigt wurde, wird die Nettoaufnahme von Na^+ durch das Verhältnis von passivem In- und aktivem Efflux bestimmt (Davenport et al., 1997). Überschüssiges Na^+ wird wahrscheinlich über Na^+ -selektive Na^+/H^+ -Antiporter wieder aus der Wurzel entfernt. SOS1 ist der best-charakterisierte plasmamembranständige Na^+ -selektive Na^+/H^+ -Antiporter, dessen Aktivität über Phosphorylierung durch SOS2 reguliert wird (Qiu et al., 2002). Die Lokalisation von SOS1 an der Xylem-Symplast Grenze in Wurzeln weist auf eine Funktion im aktiven Transport von Na^+ aus der Wurzel ins Xylem hin (Shi et al., 2002). Dies könnte ein Weg sein, Salzkonzentrationen in der Wurzel zu regulieren. Aber auch andere Natriumtransporter, wie die Mitglieder der CHX-Familie, könnten für den Natriumefflux wichtig sein (Pardo et al., 2006).

Eine weitere Strategie hohe Na^+ -Konzentrationen zu vermeiden, ist die Entfernung von Na^+ aus dem Xylem entweder schon in der Wurzel, im Mesokotyl, im Spross oder am Blattansatz. Wahrscheinlich sind Mitglieder der *HKT* Genfamilie am Transport von Natrium aus dem Xylem beteiligt. So entfernt der Uniporter HKT1 aus Arabidopsis in der Wurzel Natrium aus dem Xylem (Davenport et al., 2007; Sunarpi et al., 2005) und ist damit einer der Hauptkontrollpunkte für den Natriumgehalt in den grünen Geweben von *Arabidopsis thaliana*. Auch eine Rezirkulation des Na^+ über das Phloem wurde schon für einige Arten gezeigt (Lupine: Munns et al., 1988; Paprika: Blom-Zanstra et al., 1998; Mais: Lohaus et al., 2000). Wahrscheinlich können jedoch nur kleine Natriummengen über das Phloem rezirkuliert werden, so dass die Natriummenge in den Blättern hauptsächlich über die Prozesse, die die Natriumkonzentrationen im Xylem beeinflussen, kontrolliert wird.

Auf Grund der beobachteten veränderten K^+ -Konzentrationen in den grünen Geweben von *cpk21* und *cpk23* im Vergleich zu Col-0 ist auch eine Regulation von Kaliumkanälen und –transportern durch die beiden Proteine denkbar. Kalium ist das häufigste Element in Pflanzen und macht bis zu 10 % des Trockengewichts aus. Mittels Aufnahme und Abgabe von Kalium regulieren Zellen ihren Turgordruck und ihr Wasserpotential. Damit hat Kalium eine wichtige Funktion in der Osmoregulation unter osmotischem Stress, wie er auch unter Salzstressbedingungen vorkommt. Des weiteren inhibieren hohe Salzkonzentrationen im Boden die Kaliumaufnahme. Kaliumaufnahme und –transport innerhalb der Pflanze werden von verschiedenen Familien von Kaliumkanälen und –transportern übernommen, die sich in ihrer Affinität, Selektivität und energetischen Kopplung unterscheiden. Wenigstens 35 Gene codieren in *A. thaliana* für Kaliumtransportsysteme (Mäser et al., 2001), darunter die drei Familien der Shaker-, TPK- und Kir-like-Kanäle (Véry und Sentenac, 2003). Alle Shaker-Kanäle und TPK4 aus der TPK-Familie liegen Plasmamembran-lokalisiert vor, während die Kir-like- und TPK-Kanäle, mit Ausnahme von TPK4 vakuolär vorliegen (Czempinski et al., 2002; Voelker et al., 2006). Aus der Shaker-Familie von Kaliumkanälen hat AKT1 eine bedeutende Funktion in der Kaliumaufnahme über die Wurzel, SKOR transportiert K^+ ins Xylem, in Schließzellen sind KAT1 und KAT2 als „Outward-Rectifier“ an der Stomataöffnung und GORK als „Inward-Rectifier an der Stomataschließung beteiligt. AKT2,3 ist eventuell an der Rezirkulation von Kalium über das Phloem beteiligt und spielt damit eine wichtige Rolle in der Kaliumhomöostase (Marten et al., 1999).

Der Kalium-selektive Tonoplast-lokalisierte Kanal TPK1 spielt eine Rolle in der intrazellulären Kaliumhomöostase und dient dem Erhalt des Turgordrucks zur Zellexpansion sowie der Aufrechterhaltung optimaler cytosolischer Kaliumkonzentrationen, der das Wachstum unter Kaliumüberschuss- und –mangelbedingungen beeinflusst (Gobert et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Bindung eines 14-3-3 Proteins an den phosphorylierten Transporter die Aktivität steigert (Latz et al., 2007).

Die Funktion von Tonoplast-lokaliserten Mitgliedern der HAK/KT/KUP Transporter-Familie ist eventuell der Kaliumtransport aus der Vakuole ins Cytosol unter Kaliummangelbedingungen, wie sie auch unter Salzstress herrschen (Walker et al., 1996). AtHAK2, AtHAK6 und AtHAK11 aus der Familie der HAK/KT/KUP Kaliumtransporter sind eventuell an Reaktionen auf Salzstress beteiligt, da ihre Expression salzabhängig reguliert wird (Maathuis, 2006).

Eine Möglichkeit die Interaktion und damit mögliche Regulation der Aktivität von Kaliumkanälen durch CPK21 und CPK23 *in planta* zu untersuchen, stellt die Bimolekulare

Fluoreszenz Komplementation (BiFC) dar (Walter et al., 2004). Dabei werden ein N-terminales und ein C-terminales Fragment des fluoreszierenden Proteins YFP mit zwei potentiellen Interaktionspartnern fusioniert. Eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen ermöglicht die Assoziation der beiden YFP-Fragmente und führt zur Bildung eines bimolekularen Fluoreszenz-Komplexes. Die erhaltenen Daten müssen dabei durch BiFC-Tests mit Proteinvarianten mit mutagenisierter Interaktionsstelle bestätigt werden (Kerppola, 2006). Das heißt, erst nach der Identifizierung von Interaktionsstellen von CDPKs mit ihren Substraten können verlässliche Daten mit dieser Methode erhalten werden. Man geht davon aus, dass die N-terminale variable Domäne von CDPKs für Substratbindung und –spezifität verantwortlich ist. Dies konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden.

Mit Patch-Clamp Versuchen in *Xenopus leavis* Oocyten, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Hedrich, Universität Würzburg sollte die Regulation von Kaliumkanälen durch CPK21 und/oder CPK23 untersucht werden. Mit dieser Methode lassen sich Ionenselektivität, Ionenflussrichtung und Abhängigkeiten von Spannung, pH-Wert, K^+ oder Ca^{2+} für Plasmamembran-lokalisierte Kanäle aufklären. Mittels heterologer Expression in *Xenopus leavis* Oocyten wurde gezeigt, dass AtPP2CA, eine mit ABI1 nah verwandte Phosphatase, die Aktivität von AKT2 (Cherel et al., 2002) und CIPK23, nach Bindung von CBL1 oder CBL9, die Aktivität von AKT1 reguliert (Li et al., 2006).

Aufgrund der Lokalisation von CPK21 und CPK23 in der Plasmamembran und im Tonoplast ist eine Regulation der K^+ -Aufnahme und Sequestrierung denkbar. In ersten Experimenten, in denen die „full-length“ CDPKs mit den Kaliumkanälen KAT1, AKT2 und GORK aus der Shaker-Familie von Kaliumkanälen in *Xenopus leavis* Oocyten exprimiert wurden, zeigten CPK21 und CPK23 keinen Einfluss auf die Aktivität der untersuchten Kanäle. Da es sich bei CDPKs um calciumregulierte Enzyme handelt und unter den gewählten Bedingungen, die beiden CDPKs eventuell nicht aktiv vorliegen, werden in weiteren Experimenten die konstitutiv aktiven vk-Varianten verwendet. Dazu liegen allerdings noch keine Daten vor.

4.8 Ausblick

Der steigende Landverlust auf Grund von Versalzung und Trockenheit von Böden als Folge der globalen Klimaerwärmung stellt ein großes Problem für die Landwirtschaft dar, da die meisten Nutzpflanzen nicht tolerant gegenüber abiotischen Stressfaktoren sind. Abiotische Stressfaktoren und besonders Salzstress reduzieren im Durchschnitt den Ernteertrag der Hauptnutzpflanzen um 50 Prozent (Bray et al., 2000). Die Erzeugung Salz-toleranterer Nutzpflanzen zur Sicherung der zukünftigen Ernährung der Weltbevölkerung ist eine der wichtigsten Aufgabenstellungen der Biotechnologie. Dafür ist ein tiefes Verständnis der Adaption und Toleranz von abiotischen Stressfaktoren essentiell. An der Toleranz abiotischer Stressfaktoren sind jedoch eine Vielzahl von Genen beteiligt, die für die Stressperzeption und Signaltransduktion verantwortlich sind sowie Schutzfunktionen übernehmen. Dabei stellt das komplexe Signaltransduktionsnetzwerk aus negativen - und positiven Regulatoren sowie Feedback-Mechanismen, bei denen mehrere unterschiedliche Signalwege überlappen oder die gleichen Funktionen übernehmen können, eine große Herausforderung für die gentechnische Erzeugung Salz-toleranterer Nutzpflanzen dar.

A. thaliana ist auf Grund des vollständig sequenzierten Genoms, der Vielzahl charakterisierter Mutanten, vorhandener Genexpressionsdaten und bereits durchgeführter vielfältiger physiologischer, biochemischer und genetischer Untersuchungen einen wertvollen Modellorganismus dar, Signalmoleküle und deren Funktionen in Salzstress-assoziierten Signalwegen zu identifizieren. Die in dieser und anderen Arbeiten gewonnenen Daten könnten der Erzeugung Salz-toleranterer Nutzpflanzen durch gezielte Manipulation von Signalmolekülen dienen, um maximale Ernteerträge unter suboptimalen Bedingungen zu gewährleisten.

5 Literatur

- Abbasi F, Onodera H, Toki S, Tanaka H und Komatsu S (2004) OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberillin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol* 55: 541-552
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E und Schroeder JI (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411: 1053-1057
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab 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, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC und Ecker JR (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Apse MP und Blumwald E (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett* 581: 2247–2254
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA und Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258
- Batistič O, Sorek N, Schültke S, Yalovsky S und Kudla J (2008) Dual Fatty Acyl Modification Determines the Localization and Plasma Membrane Targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ Signaling Complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 1346–1362
- Benning G (1999) Positionelle Klonierung des *GCA2*-Locus aus *Arabidopsis thaliana*. Diss ETH Nr. 13163
- Berberich T und Kusano T (1997) Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. *Mol Gen Genet* 254: 275-283
- Bhandal IS und Malik CP (1988) Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism in flowering plants. *International Review of Cytology* 110: 205-254
- Blom-Zandstra M, Vogelzang SA und Veen BW (1998) Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. *J Exp Bot* 49: 1863-1868
- Blumwald E, Aharon GS und Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 140-151
- Böhmer M und Romeis T (2007) A chemical-genetic approach to elucidate protein kinase function *in planta*. *Plant Mol Biol* 65: 817-827
- Bohnert HJ (2001) Evolutionary conservation and uniqueness of salinity stress responses. Aus: Blumwald E, Rodrigues-Navarro A, eds. Workshop on molecular basis of ionic homeostasis and salt tolerance in plants. Madrid: Instituto Juan, März, 49
- Bohnert HJ und Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations, making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1: 267-274
- Bordas M, Montosinos C, Dabauza M, Salvador A, Roig V, Serrano R und Moreno V (1997) Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* 6: 41-50
- Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M und Arteca RN (1996) Calcium-dependent protein kinase dependent gene expression in response to physical and chemical stimuli in mung-bean (*Vigna radiata*). *Plant Mol Biol* 30: 1129-1137

- Boudsocq M und Lauriere C (2005) Osmotic Signaling in Plants. Multiple Pathways Mediated by Emerging Kinase Families. *Plant Physiol* 138: 1185–1194
- Bray EA, Bailey-Serres J und Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Editors: Gruissem W, Buchanan B, Jones R, American Society of Plant Physiologists 1158-1249
- Bucher P und Bairoch A (1994) A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2: 53-61
- Burgess WH, Jemiolo DK und Kretsinger RH (1980) Interaction of Calcium and Calmodulin in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta* 623: 257-270
- Chandran V, Stollar EJ, Lindorff-Larsen K, Harper JF, Chazin WJ, Dobson CM, Luisi BF und Christodoulou J (2005) 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 und DasGupta M (1999) Autophosphorylation-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase from Groundnut. *Plant Physiol* 120: 859-866
- Cheeseman JM (1982) Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. *Journal of Membrane Biology* 70: 157-164
- Cheng S-H, Willmann MR, Chen H-C und Sheen J (2002) Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiol* 129: 469-485
- Cherel T, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H und Thibaud J-B (2002) Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* 14: 1133-1146
- Chico JM, Raices M, Tellez-Inon MT und Ulloa RM (2002) A Calcium-Dependent Protein Kinase Is Systemically Induced upon Wounding in Tomato Plants. *Plant Physiol* 128: 256-270
- Chinnusamy V, Jagendorf A und Zhu J-K (2005) Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Sci* 45: 437-448
- Chinnusamy V, Schumaker K und Zhu J-K (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55: 225-236
- Choi H-I, Park H-J, Park J H, Kim S, Im M-Y, Seo H-H, Kim Y-W, Hwang I und Kim S Y (2005) Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase AtCPK32 Interacts with ABF4, a Transcriptional Regulator of Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, and Modulates Its Activity. *Plant Phys* 139: 1750–1761
- Chomczynski P und Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 162: 156-159
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y und Grill E (2006) Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses. *Plant Biol* 8: 314-325
- Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF und Chazin WJ (2004) Evidence for different roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279: 29092-29100
- Clought SJ und Bent AF (1998) Floral Dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743

- Czempinski K, Frachisse JM, Maurel C, Barbier-Brygoo H und Müller-Röber B (2002) Vacuolar membrane localisation of the *Arabidopsis* 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant J* 29: 809-820
- Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky S M, Hrabak E M, Harmon A C, Pickard B G und Harper J F (2003) Subcellular Targeting of Nine Calcium-Dependent Protein Kinase Isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1840–1848
- Davenport RJ, Muñoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A und Tester M (2007) The Na⁺ transporter AtHKT1 controls xylem retrieval of Na⁺ in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 30: 497–507
- Davenport RJ, Reid RJ und Smith FA (1997) Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity response. *Physiologica Plantarum* 99: 323-327
- Day IS, Reddy VS, Ali GS und Reddy ASN (2002) Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology* 3: 1-24
- Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA und Davies J (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺- permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci* 116: 81-88
- Demidchik V, Davenport RJ und Tester MA (2002) Non-selective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 67-107
- Dubcovsky J, Santa Maria G, Epstein E, Luo M-C und Dvořák J (1996) Mapping of the K⁺/Na⁺ discrimination locus *Knal* in wheat. *Theor and Appl Genet* 92: 448-454
- Edwards K, Johnstone C und Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349
- Epstein E (1998) How Calcium Enhances Plant Salt Tolerance. *Science* 280: 1906-1907
- Epstein E (1961) The essential role of Calcium in selective cation transport by plant cells. *Plant Physiol* 36: 437-444
- Espinosa-Ruiz A, Belles JM, Serrano R und Cullianez-Macla V (1999) *Arabidopsis thaliana* *AtHAL3*: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J* 20: 529-539
- Evans NH, McAinsh MR und Hetherington AM (2001) Calcium oscillations in higher plants. *Plant Biol* 4: 415-420
- Ganguly S und Singh M (1998) Characterization of a second calcium-dependent protein kinase from winged bean. *Phytochemistry* 48: 61-70
- Gao L und Xiang C-B (2008) The genetic locus At1g73660 encodes a putative MAPKKK and negatively regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 67: 125–134
- Gaxiola RA, Li JS, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL und Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *PNAS* 98: 11444–114449
- Gobert A, Isayenkov S, Voelker, Czempinski K und Maathuis FJM (2007) The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K₊ conductance and plays a role in K homeostasis. *PNAS* 104: 10726–10731
- Halfter U, Ishitani M und Zhu J-K (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *PNAS* 97: 3735-3740

- Harmon AC, Yoo BC und McCaffery C (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33: 7278-7287
- Harmon AC, Putnam-Evans C und Cormier MJ (1987) A Calcium-Dependent but Calmodulin-Independent Protein Kinase from Soybean. *Plant Physiol* 83: 830-837
- Harper JF, Huang JF und 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 und Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Mol Plant Physiol* 51:463-499
- Hegeman AD, Rodriguez M, Han BW, Uno Y, Phillips Jr GN, Hrabak EM, Cushman JC, Harper JF, Harman AC und Sussman MR (2006) A phyloproteomic characterization of *in vitro* autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics* 6: 3649-3664
- Hetherington AM und Brownlee C (2004) The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 401-427
- Hoekstra FA, Golovia EA und Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 431-438
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z und Verma DPS (2000) Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* 122: 1129-1136
- Hua B-G, Mercier RW, Leng Q und Berkowitz GA (2003) Plants do it differently. A new basis for potassium/ sodium selectivity in the pore of an ion channel. *Plant Physiol* 132: 225-245
- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ (2007) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 50: 414-428
- Huang, JF, Teyton, L, und Harper, JF (1996) Activation of a Ca(2+)- dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. *Biochemistry* 35: 13222-13230
- Hurkman WJ und Tanaka CK (1987) The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol* 83: 517-524
- Hwang I, Sze H und Harper JF (2000) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺-pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *PNAS* 97: 6224-6229
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T und Shinozaki K (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant J* 24:655-665
- Jia W, Wang Y, Zhang S und Zhang J (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* 53: 2201-2206
- Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, Suefferheld M und Rieger M (1997) Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ* 20: 609-616
- Kerppola TK (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols* 1: 1278-1286
- Knight H, Trewavas AJ und Knight MR (1997) Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067-1078

- Koiwa H, Bressan RA und Hasegawa PM (2006) Identification of plant stress-responsive determinants in *Arabidopsis* by large-scale forward genetic screens. *J Exp Bot* 57: 1119-1128
- Koncz C und Schell J (1986) The Promoter of Tl-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector. *Mol Gen Genet* 204: 383-396
- Kwak JM, Mori IC, Pei Z-M, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG und Schroeder JI (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO* 22: 2623-2633
- Latz A, Becker D, Hekman M, Müller T, Beyhl D, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR und Hedrich R (2007) TPK1, a Ca^{2+} -regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K^+ channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* 52: 449-459
- Lee J-Y, Yoo BC und Harmon AC (1998) Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry* 37: 6801-6809
- Leonhardt N, Kwak J-M, Robert N, Waner D, Leonhardt G und Schroeder JI (2004) Microarray Expression Analyses of *Arabidopsis* Guard Cells and Isolation of a Recessive Abscisic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant. *The Plant Cell* 16: 596-615
- Leung J und Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222
- Leung J, Merlot S und Giraudat J (1997) The *Arabidopsis abscisic acid-insensitive2 (ABI2)* and *ABII* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* 9: 759-771
- Li L, Kim B-G, Cheong YH, Pandey GK und Luan S (2006) A Ca^{2+} signaling pathway regulates a K^+ channel for low-K response in *Arabidopsis*. *PNAS* 103: 12625-12630
- Li WG und Komatsu S (2000) Cold stress-induced calcium-dependent protein kinase(s) in rice (*Oryza sativa* L.) seedling stem tissues. *Theor Appl Genet* 101: 355-363
- Liu G, Cheng J und Wang (2006) *VfCPK1*, a gene encoding calcium-dependent protein kinase from *Vicia faba*, is induced by drought and abscisic acid. *Plant Cell and Environ* 29: 2091-2099
- Locy RD, Chang CC, Nielsen BL und Singh NK (1996) Photosynthesis in Salt-Adapted Heterotrophic Tobacco Cells and Regenerated Plants. *Plant Physiol* 110: 321-328
- Lohaus G, Hussmann M, Pennewiss K, Schneider H, Zhu J-J und Sattelmacher B (2000) Solute balance of maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J Exp Bot* 51: 1721-1732
- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones JDG und Romeis T (2005) Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *PNAS* 102: 10736-10741
- Ma S-Y und Wu W-H (2007) *AtCPK23* functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Mol Biol* 65: 511-8
- Maathuis FJM (2006) The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal Exp Bot* 57: 1137-1147
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA und Gueriot ML (2001) Phylogenetic relationships, within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 12: 1646-1667

- Mahajan S und Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139–158
- Mano Y und Takeda K (1997) Diallel Analysis of Salt Tolerance at Germination and the Seedling Stage in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Breeding Science* 47: 203-209
- Marten I, Hoth S, Deeken R, Ache P, Ketchum KA, Hoshi T und Hedrich R (1999) AKT3, a phloem localized K⁺ channel is blocked by protons. *PNAS* 96: 7581-7586
- Martin ML und Busconi L (2001) A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol* 125: 1442-1449
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M und Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinosaki K, Matsumoto K und Shinosaki K (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 93: 765-769
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemase S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM und Schroeder JI (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* 4: 1749-1761
- Munns R, Hare RA, James RA und Rebetzke GJ (2000) Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal for Agricultural Research* 51: 69-74
- Munns R, Cramer GR und Ball MC (1999) Interactions between rising CO₂, soil salinity and plant growth. In: *Carbon dioxide and environmental stress*. Academic Press 139-167
- Munns R, Tonnet L, Shennan C und Gardner PA (1998) Effect of high external NaCl concentration on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. II. Ions in phloem sap. *Plant, Cell and Environment* 11: 291-300
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K und Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 60: 51–68
- Nakayama S, Kawasaki H und Kretsinger R (2000) Evolution of EF-hand proteins. *Aus: Calcium Homeostasis* (Edited by: Carafoli E, Krebs J). New York: Springer, 29-58
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M und Kuchitsu K (2008) Synergistic Activation of the *Arabidopsis* NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 283: 8885–8892
- Ohta M, Guo Y, Halfter U und Zhu JK (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *PNAS* 100: 11771-11776
- Oono YM, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinosaki K und Shinosaki K (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* 34: 868-887
- Pandey S und Assmann SM (2004) The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein a subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16: 1616–1632

- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO und Quintero FJ (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* 57: 1181–1199
- Patharkar OR und Cushman JC (2000) A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two component pseudo-response regulator. *Plant J* 24: 679-691
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E und Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
- Qiu Q-S, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS und Zhu J-K (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 und SOS3. *PNAS* 99: 8436-8441
- Quesada V, Garc3ya-Mart3ynez S, Piqueras P, Ponce MR und Micol JL (2002) Genetic Architecture of NaCl Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130: 951–963
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR und Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439: 290-294
- Reddy ASN (2000) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 160: 381-404
- Reddy ASN (1993) Calcium and signal transduction in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 12: 185-211
- Rock CD (2000) Pathways to ABA-regulated gene expression. *New Phytol* 148: 357-396
- Rodriguez Milla MA, Uno Y, Chang I-F, Townsend J, Maher EA, Quilici D und Cushman JC (2006) A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: Characterization of the interaction between CPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. *FEBS Lett* 580: 904-911
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R und Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence. *EMBO J* 20: 5556-5567
- Romeis T, Piedras P und Jones JDG (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12: 803-815
- Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR und Allen RD (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* 41: 1229–1234
- Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER und Allen RD (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnol* 15: 988–991
- Rubio F, Gassmann W und Schroeder JI (1995) Sodium driven potassium uptake by the plant potassium uptake transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270: 1660-1663
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA und Hasegawa PM (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na^+ entry into plant roots. *PNAS* 98: 14150-14155
- Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, Oecking C und Schaller A (2002) *LeCPK1*, a Calcium-Dependent Protein Kinase from Tomato. Plasma Membrane Targeting and Biochemical Characterization. *Plant Physiol* 129: 156-168

- Saha P und Singh M (1995) Characterization of a winged bean (*Psophocarpus tragonolobus*) protein kinase with a calmodulin-like domain: regulation by autophosphorylation. *Biochem J* 305: 205-210
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K und 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, Pelloux J, Brownlee C und Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signalling. *Plant Cell*, S401-S417
- Satoh RK, Nakashima MS, Shinosaki K und Yamaguchi-Shinosaki K (2002) ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hyperosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 709-719
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM und Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 627-658
- Sebastia CH, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ und Huber SC (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation *in vitro* that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Arch Biochem Biophys* 428: 81-91
- Seemann JR und Critchley C (1985) Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164: 151-162
- Sheen J (2001) Signal Transduction in Maize and Arabidopsis Mesophyll Protoplasts. *Plant Physiol* 127: 1466–1475
- Sheen J (1996) Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274: 1900-1902
- Shen Y-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Du S-Y, Cao Z, Shang Y, Wang X-L, Peng C-C, Yu X-C, Zhu SY, Fan R-C, Xu Y-H und Zhang D-P (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823-826
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM und Zhu J-K (2002) The putative plasma-membrane Na^+/H^+ Antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell* 14: 465-477
- Shinozaki K und Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217-223
- Sickler CM, Edwards GE, Kiirats O, Gao Z und Loescher W (2007) Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Funct Plant Biol* 34: 382–391
- Slovik S, Daeter W und Hartung W (1995) Compartmental redistribution and long-distance transport of abscisic acid (ABA) in plants as influenced by environmental changes in the rhizosphere – a biomathematical model. *J Exp Bot* 46: 881-894
- Smirnoff N und Cumbes QJ (1989) Hydroxylradical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060
- Song W-Y, Zhang Z-B, Shao H-B, Guo X-L, Cao H-X, Zhao H-B, Fu Z-Y und Hu X-J (2008) Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *Int J Biol Sci* 4: 116-125

- Sunarpi, Hori T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan W-Y, Leung H-Y, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI und Uozumi N (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* 44: 928–938
- Tähtiharju S, Sangwan V, Monroy AF, Dhinsa RS und Borg M (1997) The induction of *kin* genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta* 203: 442-447
- Tester M und Davenport R (2003) Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Annals of Botany* 91: 503-527
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol* 50: 571-599
- Trewavas AJ, Malho R, (1998) Ca²⁺ signaling in plant cells: the big network! *Curr Opin Plant Biol* 1: 428-433
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K und 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. *PNAS* 97: 11632-11637
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muti S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T und Schroeder JI (2000) The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 122:1249-1259
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N und Shinozaki K (1994) Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 244: 331-340
- Verslues PE und Bray EA (2006) Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot* 57: 201-212
- Verslues PE und Zhu J-K (2005) Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions* 33: 375-379
- Véry AA und Sentenac H (2003) Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Ann Rev Plant Biol* 54: 575-603
- Vitart V, Christodoulou J, Huang JF, Chazin WJ und 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
- Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B und Czempinski K (2006) Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. *Plant J* 48: 296–306
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P und Baulcombe DC (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949–956
- Walker DJ, Leigh RA und Miller AJ (1996) Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. *PNAS* 93: 10510-10514

- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K und Kudla J (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 428–438
- Wang J, Zhang, H und Allen RD (1999) Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 40: 725–732
- Webb AA, Larman MG, Montgomery LT, Taylor JE, Hetherington AM (2001) The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant J* 26: 351-362
- Witte CP, Noel LD, Gielbert J, Parker JE und Romeis T (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eightamino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol* 55: 135-147
- Wyn Jones RG, Brady CJ und Spears J (1979) Ionic and osmotic relations in plant cells. In: Laidman DL, Wyn Jones RG, eds. *Recent advances in the biochemistry of cereals*. London: Academic Press 63-103
- Xiong L und Zhu J-K (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 25: 131-139
- Xiong LM, Ishitani HL und Zhu J-K (2001) The Arabidopsis *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083
- Xu J, Li H-D, Chen L-Q, Wang Y, Liu L-L, He L und Wu W-H (2006) A Protein Kinase, Interacting with Two Calcineurin B-like Proteins, Regulates K⁺ Transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* 125: 1347-1360
- Yoo BC und Harmon AC (1996) Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 35: 12029-12037
- Yoo S-D, Cho Y-H, Tena G, Xiong Y und Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* 451: 789-795
- Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1565-1572
- Young JJ, Mehta S, Israelsson M, Godoski J, Grill E und Schroeder JI (2006) CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *PNAS* 103: 7506-7511
- Yu X-C, Li M-J, Gao G-F, Feng H-Z, Geng X-Q, Peng C-C, Zhu S-Y, Wang X-J, Shen Y-Y und Zhang D-P (2006) Abscisic Acid Stimulates a Calcium-Dependent Protein Kinase in Grape Berry. *Plant Physiol* 140: 558-579
- Zeevaart JAD und Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439-473
- Zhang H-X, Hodson JN, Williams JP und Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *PNAS* 98: 12832-12836
- Zhao Y, Pokutta S, Maurer P, Lindt M, Franklin RM und 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 GY, Kinet JM und Lutts S (2001) Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F-3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behaviour during vegetative growth. *Euphytica* 121: 251-263

Zhu J-K (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 66-71

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 und Zhang D-P (2007) Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:3019-3036

Zielinski RE (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 697-725

6 Anhang

Tabelle 1: Primer zur Amplifizierung von Markergenen für abiotischen Stress

Primerbezeichnung	Sequenz	Beschreibung
<i>actin2</i> frw	5'-GTGAACGATTCTGACCTGCCTC-3'	Actin2 5'-Primer
<i>actin2</i> rev	5'-GAGAGGTTACATGTTACCACAAC-3'	Actin2 3'-Primer
<i>RD 29A</i> frw	5'-CTCCTTCTGCACCGGAACAACAGTG-3'	RD29A 5'-Primer
<i>RD 29A</i> rev	5'-CTCCGGTCAATGAGAAGGATCAAG-3'	RD29A 3'-Primer
<i>RD 29B</i> frw	5'-CTGCTTGCTCATGACCATAAGGAC-3'	RD29B 5'-Primer
<i>RD 29B</i> rev	5'-GTCTTCTTCTCTCCTCCTCTCC-3'	RD29B 3'-Primer
<i>COR 15a</i> frw	5'-CTTTGTGGCATCCTTAGCCTCTCC-3'	COR15a 5'-Primer
<i>COR 15a</i> rev	5'-CTCAGGAGCTGTTCTCACTGGTATG-3'	COR15a 3'-Primer
<i>DRB 1a</i> frw	5'-CCATAACGATACGTCGTCATCATC-3'	DRB1a 5'-Primer
<i>DRB 1a</i> rev	5'-GTGGGTTTGTGAGGTTAGAGAAC-3'	DRB1a 3'-Primer
<i>ABI1</i> frw	5'-GATGGTCGGTTTGTATCCTCAA-3'	ABI1 5'-Primer
<i>ABI1</i> rev	5'-CTCACACGCTTCTTCATCCGT-3'	ABI1 3'-Primer
<i>ABI2</i> frw	5'-GATGAGTTTGTATCCGAGATCGA-3'	ABI2 5'-Primer
<i>ABI2</i> rev	5'-CACTTCTGGATCCGGAATTACT-3'	ABI2 3'-Primer
<i>ABA1</i> frw	5'-GCTGCAATTATGGCTTCCACT-3'	ABA1 5'-Primer
<i>ABA1</i> rev	5'-TCGAAGATCCATCAAGAAGAAAGCT-3'	ABA1 3'-Primer
<i>RD 22</i> frw	5'-GACCATTGAGGAGTGTGAAGCC-3'	RD22 5'-Primer
<i>RD 22</i> rev	5'-CACACAACATGAGTCTCCGGG-3'	RD22 3'-Primer
<i>ABF1</i> frw	5'-ACAACCTTAGGCGGCGATAC-3'	ABF1 5'-Primer
<i>ABF1</i> rev	5'-GCAACCGAAGATGTAGTAGTCA-3'	ABF1 3'-Primer
<i>ABF2</i> frw	5'-GGGAATGAGCCACCAGGAG-3'	ABF2 5'-Primer
<i>ABF2</i> rev	5'-GAGAAACCTGTGTTGGCATCATTAC-3'	ABF2 3'-Primer
<i>ABF4</i> frw	5'-AACTGTGTTCAACAGATGGGTCAG-3'	ABF4 5'-Primer
<i>ABF4</i> rev	5'-GGTCCGTAAGTACTAATCC-3'	ABF4 3'-Primer
<i>GST6</i> frw	5'-TCAAGCTCGTCTTCCCTTGT-3'	GST6 5'-Primer
<i>GST6</i> rev	5'-GGTTGCCTTGACTTTCTTGC-3'	GST6 3'-Primer
<i>P5CS1</i> frw	5'-TTTATGGTGCTATAGATCACA-3'	P5CS1 5'-Primer
<i>P5CS1</i> rev	5'-GAATGTCTGATGGGTGTAAC-3'	P5CS1 3'-Primer

Tabelle 2: Primer zur Identifizierung homozygoter *cpk21* und *cpk23* Linien

Primerbezeichnung	Sequenz	Beschreibung
21/23 frw	5'-caccATGGGTTGTTTCAGCAGTAAAC-3'	CPK21/23 5' (bindet vor T-DNA Insertion)
21 rev	5'-CCGTAACCTTCGCCTTAATACTT-3'	bindet hinter T-DNA Insertion
23 frw	5'-CACTGTGTTATCACGTATGAAGC-3'	bindet vor T-DNA Insertion
23 rev	5'-GTGGAATGGATACTGTTTCCCTT-3'	CPK23 3' (bindet hinter T-DNA Insertion)
SALK-Lba	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATC-3'	SALK-Lba

Tabelle 3: Primer zur Untersuchung der *CPK21* und *CPK23* Transkription in *cpk21* und *cpk23*

Primerbezeichnung	Sequenz	Beschreibung
21/23 5'	5'-caccATGGGTTGTTTTCAGCAGTAAAC-3'	CPK21/23 frw (bindet vor T-DNA Insertion)
21 rev	5'-ATCCTTGGATCAAAGGGGGAGAA-3'	CPK21 rev (bindet hinter T-DNA-Insertion)
21 frw	5'-GGGAGTGCTTACTACGTTGCTCCA-3'	CPK21 frw (bindet hinter T-DNA-Insertion)
23 rev	5'-GCTGATTTCTTTTCCGTA ACTCTG-3'	CPK21 rev (bindet vor T-DNA-Insertion)
23 3'	5'-GTGGAATGGATACTGTTTCCCTT-3'	CPK23 rev (bindet hinter T-DNA-Insertion)
23 frw	5'-caccGGAATTTTCGTGCGATGATGAGATG-3'	CPK23 frw (bindet hinter T-DNA-Insertion)

Tabelle 4: Primer für die zielgerichtete Mutagenese in *CPK21* und *CPK23*

Primerbezeichnung	Sequenz	Beschreibung
21 ef1F	5'-gcgaatatagCtaccGcaaaagcggga-3'	frw-EF1 Mutagenese CPK21
21 ef1R	5'-tcccgttttgGcggtgGctatattcgc-3'	rev-EF1 Mutagenese CPK21
21 ef2F	5'-gaagccgctgCcgctgCtggtatgg-3'	frw-EF2 Mutagenese CPK21
21 ef2R	5'-ccattaccaGcgacgGcagcggcttc-3'	rev-EF2 Mutagenese CPK21
21 ef3F	5'-tccaacactttgCtaaagCcaacagcgggcac-3'	frw-EF3 Mutagenese CPK21
21 ef3R	5'-gtgcccgtgttgGctttaGcaaagtgttga-3'	rev-EF3 Mutagenese CPK21
21 ef4F	5'-gttatatccgaagttgCtaccgCcaatgatggaagaat-3'	frw-EF4 Mutagenese CPK21
21 ef4R	5'-attctccatcattgGcggtgGcaactcggatataac-3'	rev-EF4 Mutagenese CPK21
21mut frw	5'-ggtgtggttcacgagCtctcaagcctgag-3'	frw-D204A Mutagenese CPK21
21mut rev	5'-ctcaggcttgagaGctc gatgaaccacacc-3'	rev-D204A Mutagenese CPK21
23 ef1F	5'-gtttgcgaatatggCtaccGctagaagcgggaca-3'	frw-EF1 Mutagenese CPK23
23 ef1R	5'-tgteccgcttctaGCggtgGccatattcggaaaac-3'	rev-EF1 Mutagenese CPK23
23 ef2F	5'-tgaagcgtctgCtgtggCtggtaatggaacaa-3'	frw-EF2 Mutagenese CPK23
23 ef2R	5'-ttgttcattaccaGccacaGcagacgttca-3'	rev-EF2 Mutagenese CPK23
23 ef3F	5'-cattccaacacttagCtaaagCcaaaaatgggcacata-3'	frw-EF3 Mutagenese CPK23
23 ef3R	5'-tatgtgcccattttgGctttaGctaagtgttgaatg-3'	rev-EF3 Mutagenese CPK23
23 ef4F	5'-tatccgaagttgCcaccgCcaatgatgga-3'	frw-EF4 Mutagenese CPK23
23 ef4R	5'-tttccatcattgGcggtgGcaactcggata-3'	rev-EF4 Mutagenese CPK23
23mut frw	5'-gtgtgattcatcagCtctcaagcctgag-3'	frw-D193A Mutagenese CPK23
23mut rev	5'-ctcaggcttgagaGctc gatgaatcacac-3'	rev-D193A Mutagenese CPK23

Tabelle 5: Primer zur Klonierung von CPK21, CPK21 vk und CPK23 in pXCSG-Strep, pXCS-HA-Strep und pXCSG-YFP

Primerbezeichnung	Sequenz	Beschreibung
21 frw	5'-gaattcATGGGTTGCTTCAGCAGTAAACA-3'	CPK21 5'+EcoRI
21 rev	5'-cccgggATGGAATGGAAGCAGTTTCCCC-3'	CPK21 3'+XmaI
21 vk	5'-cccgggTTCTCCCCCTTTGATCCAAGGATGTTTC-3'	CPK21 vk3'+XmaI
21 rev	5'-ATGGAATGGAAGCAGTTTCCCC-3'	CPK21 3'
GW Klonierung		
21/23 5'	5'-caccATGGGTTGTTTCAGCAGTAAAC-3'	CPK21/23 5' frw
23 3'	5'-GTGGAATGGATACTGTTTCCCTT-3'	CPK23 3' rev

Tabelle 6: Primer zur Klonierung von Promoterfragmenten von CPK21 und CPK23 in pXCS-GUS

Primerbezeichnung	Sequenz	Beschreibung
P21 frw	5'-ggcgcgccAGATCTACACCTTTTAAATATTTTCATGTTTC-3'	CPK21 Pr. 5'+AscI
P21 rev	5'-gaattcTAGTAAAGGAGGAGACTTTCGTTATTGG-3'	CPK21 Pr.3'+EcoRI
P23 frw	5'-ggcgcgccGTCCAAATTTAAAAGAAAAGCCACATTC-3'	CPK23 Pr. 5'+AscI
P23 rev	5'-cccgggGTGGAATGGATACTGTTTCCCT-3'	CPK23 Pr. 3'+EcoRI

Abbildung 1: generierte Expressionsvektoren

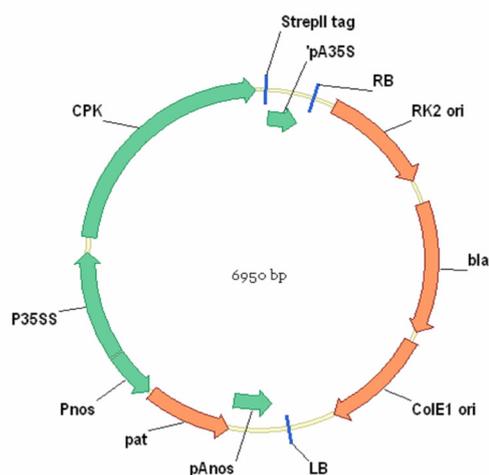
A

pXCSG-StrepII CPK21

(Wildtypenzym, vk, EF1, EF2, EF3, EF4, EF1/2, EF3/4, D204A)

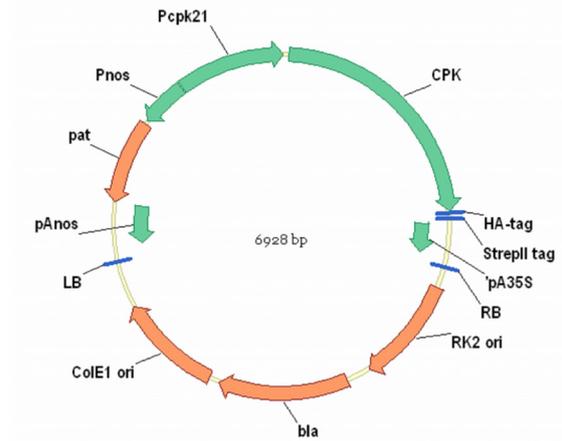
pXCSG-StrepII CPK23

(Wildtypenzym, EF1, EF2, EF3, EF4, EF1/2, EF3/4)

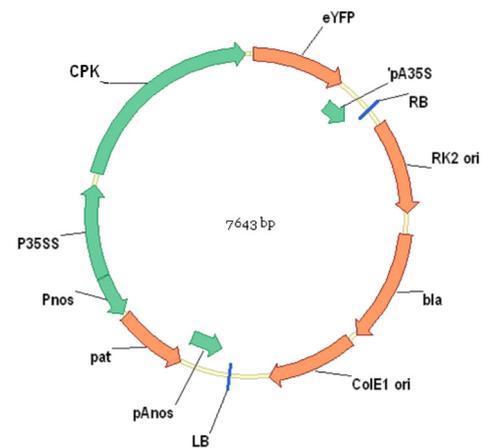


B

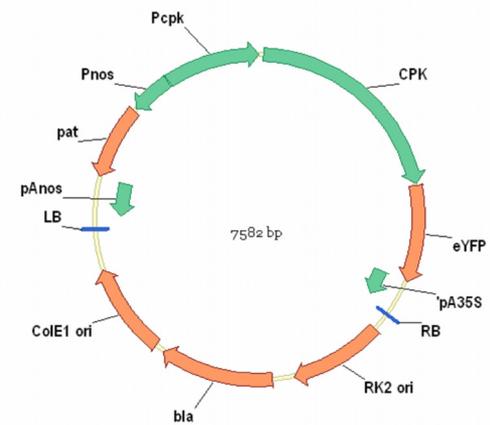
pXCS-HA-StrepII CPK21 (+ nativer Promoter)
pXCS-HA-StrepII D204A (+ nativer Promoter)

**C**

pXCSG-YFP CPK21
pXCSG-YFP CPK23

**D**

pXCS-YFP CPK21 (+ nativer Promoter)
pXCS-YFP CPK23 (+ nativer Promoter)

**E**

pXCS-GUS P_{CPK21}
pXCS-GUS P_{CPK23}

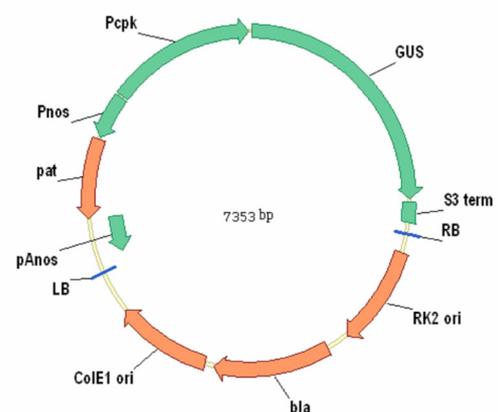


Abbildung 2: CPK21, At4g04720, genomische Sequenz

Promoter: Schwarz, 5'- und 3'-UTR: Rot, Exons: Gelb, Introns: Violett.

ataattcatgtcctctattgtaatcacgtatcttatttctaccatccaaacaataagatatgtttcttttgaat
aatgcatgttccattttatatttagacatgcatttttctaaaaatacatggattatataaaagatctacacctttta
aatatttcatgttctctactgtaataattattcatacctatccgaacaataagatgtatttcttctgataaatgca
tgttccttttataaattgcatgtattgttttaataaaatattaattcatttagatactatgttgtctgtaataa
ttcatgttttttattcagatgttaatcaactctgatttattatcactggcattattgtagaaaacaagaaaataga
aagatatttttttagtatttttacttttaaaaaatgttattttatctaaattttctgacaaaaaattatttttt
aattttgtttaattttatggttattttttatcattaaccttttttttatatcagctgtaatggaaaaatataatca
aagtaattattgacactatttttttttgaattaaaaataatattgacacttgacagttcgaaattcaatacttt
tctaattataaatggaatattctgtaccctccaataaaacaaggaatttttccggtccagaacaaatattcgaa
attttttaccataaaaattcctttgaaaaatgtaagtcaaatttaatttttaataataaattattgtg
gatatttttattttcagcaaattgacaaaagacaaaagacaatttacttaaacagttctatctattacactcagaa
ttgacgcgactgatagataaattccaattccagtcacaacaaaaccttcacaactcaatttttccgattttgggt
ttctctcttccaatcatccttcaagctcatctttttctctaccaataacgaaagctcctccttctaactaATGG
GTTGCTTCAGCAGTAAACACCGGAAAACCTCAAACGACGGCGGAGAAAAATCAATCCCGATCAATCCAGTTCAAA
CCCATGTAGTCCCCGAGCATCGTAAACCTCAAACCCCAACACCAAAACCCATGACTCAACCAATCCATCAGCAGA
TTTCAACACCGTCTTCAAATCCAGTCTCAGTTCGAGATCCAGATACGATTTTAGGTAAACCATTCGAAGACATCA
GGAAATTTTACAGCTTGGGGAAAGAATTAGGTGAGGTCAATTTGGGATTACGTATATGTGTAAAGAGATTGGTA
CTGGTAACACTTATGCTTGCAAATCGATTCTTAAGAGGAAGCTAATTAGTAAGCAAGATAAAGAAGATGTGAAGA
GAGAGATTGAGATAATGCAGTATTTGTCTGGACAACCTAACATTGTTGAGATCAAAGGTGCTTATGAAGATAGAC
AATCTATACATTTGGTTATGGAGTTGTGTGCTGGTGGTGGAGTTGTTGATAGGATTATAGCTCAAGGTCATTACT
CTGAGAGAGCTGCTGCTGGTATCATTAGGTCTATTGTCAATGTTGTTTCAGATTTGTCATTTTATGGGTGTGGTTC
ATCGAGATCTCAAGCCTGAGAATTTCTTGCTTTCGAGTAAAGAGGAGAATGCTATGCTTAAAGCTACTGATTTCG
GTTTGTCCGTCTTCATCGAAGAAGgtagctagagactcaatatagccttttttgggtctttgggtttggattggt
agtgtttggaatctataagcttgtctagtctcttttagtgtcaaagattaagagtttggtagttcattgcatgtg
atctctagcttgagtaacttctgttttccagtaacagtgagagtgatggtaaaacaattgattttgtgtttt
ctctgttcattgaagattgatcatattctttgggtatttaagatctgcaactttttttccggtgatcatgageta
gattgttgtcttatgtttccaatgcatagggatgagactcaagacacttttagtaccgagaatcgagtttatcttgt
ctttttgtacatcttttatgatattgtcaagatgtaattttcattagtttgattcttatgttaatatgcttcat
gatattgtctgtgaaaccaacaatgagGAAAAGTTTACCGGGATATAGTTGGGAGTGCTTACTACGTTGCTCCA
GAAGTATTAAGGCGAAGTTACGGAAAAGAAATCGACATTTGGAGTGCAGGTGTCATTTATACATCTTACTCAGC
GGTGTACCTCCTTTTTGGGCCGgtaaaagaccttaagctaaccaaattcattgattttgtttcttctgaggtg
tgatctatattcatatgtttatatttttagAAAATGAGAAAGGAATATTCGATGAGGTCATAAAAGGCGAAATGAT
TTTGTAAAGTGAGCCATGGCCTTCTATATCTGAAAGCGCGAAAGATCTTGTAGGAAGATGCTAACCAAAAGACCCG
AAGAGACGAATCACGGCTGCACAGGTTCTTGgtaagacaatgtgaataaccagatattttttcccactcctgtttg
tatagaatgcggtgattacatatttttagaggctcaaagccagaacaagatagtcagtccattgtataggacctcta
ggctcaaatagactctagtgaatgttgaagtctgatcttgttcttctgtctttgagtttatggctgctctaactagta
atgctttactaataatgttagccatccttatggtttatagAACATCCTTGATCAAAGGGGAGAAGCACCAGACAA
GCCTATTGATAGCGCTGTGTTATCCCGCATGAAGCAATTCCGAGCAATGAACAAGCTTAAGAAGCTAGCTCTAAA
Ggtaaagaagtggctgaaattttttatgaaattatctttcttttactaattttgcaatttcaattatccacttg
caatctctctatgctccatattgcaatgctcatatctactgggtgctgaaattttgggtgtaattttgtgtattc
tgttttcagGTTATCGCGGAGAGTCTATCAGAAGAGGAGATTAAGGCTTAAAAACCATGTTTGCGAATATAGAT
ACCGACAAAAGCGGGACAATCACTTATGAAGAACTCAAACCTGGGCTAACTAGACTTGGGTCTAGACTCTCGGAA
ACTGAAGTTAAGCAACTCATGGAAGCCgtaagttatcttcagcatcttggcttcaactttccactgttaaggtttt
gaaaaagcttgaaacacatgatgataacgtttcagGCTGACGTCGATGGTAATGGAACAATCGACTACTACGAGT
TTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTAGATCGAGATGAGCATGTATACAAAGCATTCCAACACTTTGATA
AAGACAACAGCGGgtaagtttttccattttcagttttatgaattagctctccattgttccattttgtgtcatggag
actaagtatcagatgtgtacaactattatcatgcaccaatgtaataatggcttgggtatatacaacagGCACATAA
CTAGAGATGAGTTGGAAAAGTGCCATGAAGGAATATGGAATGGGAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCG
AAGTTGATACCGACAATgtaagttgcaactctcaacatataagccaacatctcaaacattaaactgggttcttgaa
accttgtaatgaactatgttacagGATGGAAGAATAAACTTTGAAGAATTTTGCAGGATGATGAGAAGTGGCAGC
ACGCAGCCACAGGGGAAAACCTGCTTCCATTCCATTCaagtcggcataaatcccaacggttttatcaaccgaaa
cgattcttgaaccagagtagaagagctaaaccgggggtaaacccaggtgagcatagttgatatactgtctcaaa
atgttgttctatcttctctgtgtttgaaacagatattttatcttctccttagttagtctgaaactgattttgag
agactgtcatgtcttagctccttgaacagtaacatatacacttatattttttgaaactttcttgagaactttc
ttaatccttatgagctttaagtgaatcttttctagtaaatagttccttaggaatctctcttatcactctcaat
ccaagatatacaactcaagaa

Abbildung 3: CPK23, At4g04740

Promoter: Schwarz, 5'- und 3'-UTR: Rot, Exons: Gelb, Introns: Violett.

agccatttctactgaacccaaaaagtcaaaaatcagcatataaaaacacggagataaattgatttaactgaaacaaac
acaagtccacaatctaattgtcatgactgaaacaataaccggttagtatacaactgagttttgacaattcccag
acgggaagtaaacatataacttcacggcgctggttgatggttacgtaagagtaatgattcagtgccggtgcatgtgc
atggtatgaaagaagagttattgtgttttttttttagattttgaaaattacctatttttaagttttttatttgaa
aaatatacatttctctacttttaataaagattaaaaaatatgtaaataatgacaattttgtccaaattttaaaa
gaaaagccacatttctttataaattaaaaacaatattcgaattttaataattttaagttctatcacttaataattttt
cacgttataaaaaagatcaatctttcatagattgtttttctttatctttttgttcttgacaattttgtttta
atatttaaaataaaaactgttatctttaaaactgtagttatcagatattaattcatgagttttttctgttttaatt
ttatattcttttttattattaccaaatattaattagttctatttttagtaattttatattggatcattggcattttg
cctaacttgttttaagtttaattttttctgaaactaatattggaccattgacattttgcctaacttattttct
tattttctttttgtcttcaacataatttttaaccaaccaatctaaagaataaagattataaactgatctctttgt
aagaaatataaaaagagttatctttctcttatgacatcaataattctaaggccaattaaggcctccagagcagcc
caatctgagatctcgatataatttttccggtatatagaaaaaaagtccaaaatccagctcaaaaattcaaatcttt
caaaaatttcttacagttcgagtcacaacatatacaataatacaaaccaaaaatgtgttctcaatcaaatctctcc
aagtttatcttcttcttcaatccaagaagaaagtctacgaaaagtctcctcctttactaATCGGTTGTTTCAGCA
GTAACACCCGGAAACTCAAAACGACGGCGGGGAGAAAGATCAATTCCGATAATTCAGTTCAAACCCATATCG
TTGATCAAGTCCCCGATCATCGTAAACCTCAAATCCCATCACCATCGATACCCATCTCAGATTCGAGATCCAGAGA
CGATTTTAGGTAAACCATTTCGAAGACATCAGGAAATTTTACAGCTTGGGGAGAGAATTAGGTTCGAGGTGGTTTAG
GGATTACGTATATGTGCAAAGAGATTGGGACTGGGAACATTTATGCTTGCAAATCGATTCTCAAGAGGAAGCTAA
TTAGTGAGCTGGGTAGAGAAGATGTGAAGACAGAGATTAGATCATGCAGCATTTGTCTGGACAACCAACGTTG
TTGAGATCAAAGGTTCTTATGAAGACAGACATTCTGTACATTTGGTAATGGAATTATGTGCCGTTGGAGAGTTGT
TTGATAGGATTATAGCTCAAGGTCATTACTCTGAGAGAGCTGCTGCTGGTACCATTAAGTCAATTGTGGATGTTG
TTCAGATTTGTCATTTGAATGGTGTGATTTCATCGAGATCTCAAGCCTGAGAATTTCTTGTCTCGAGTAAGGAGG
AGAATGCAATGCTTAAAGTAACCGATTTCCGGTGTCCGCTTCATCGAAGAAGgttagctatagagattgatct
tttataagaatcatcttaggttgatttggatgctaattggtacgaatctatagattgtcttgacaagtctcttta
gtatctacattcatcttaggagttcactgaatcgtgatgtcatatactctagaataagaatagaatgttatgcat
aaaggagtcggatgtgaaattgataggtggtccctcctcaagccaaagagatgtgttttgtcttaacacaagaa
cacacaaagtaccaagagataaactctgtttgtcaatttcaagtctgattccttaacttgacattgaaagtct
ttaaatacacaaaaataagaaagaaaaataaccactaaatctactactaacatcgtggggagtgaggagaatacaatc
ccattaatttaggagccataacaagaccacatctctttctatgacaccggtttactctggttatgtgcttatca
gaaatgttctgtgttcattgaaataaagttagctcgagattgatcatattcttagtgattgatgattgctgtttga
taggttttgggtcctataggattgtctagcacaatctcttttagtatcaagtactgttttcgagtaacgatga
gactgttatgctcaaagcaattgattttggggttctctgttcattgaagattgatcatattctttcacgaatcg
aaaatattgcactttgtgcttttaactcatgagctagattggtgactatgtttccaatgcatagagatgggactctac
tcttttagtaataagaatcaggtttatgttcttattattgtacagatttaactatgttttctgttttcttagt
ttattttgatttttatgtttatctgtttgtgaaacaaaattacagGAAAAATTTACAAGGATGTGGTTGGGAGT
CCTTACTACGTTGCTCCTGAAGTATTAAGGCAGAGTTACGGAAAAAGAAATCGACATTTGGAGTGCAGGTGTTATT
TTATACATCTACTCTGCGGTGTACCTCCTTTTTGGGCCGgtaaaagacctttaagctaacaaaaacttcttgatt
ttttcttcttcttcttaagggtttgatctgtaatcatatgttatttttgtagACAATGAAGAAGGAGTATTCGTTGA
AATTCTAAAATGCAAAATTGATTTTGTACGTGAGCCATGGCCTTCTATATCTGACAGCGCGAAAAGATCTTGTGTA
GAAGATGCTAACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCACTGCTGCACAAGTTCTTGgtaagagaatgtgaataaccagt
cttgagtttatggctggtttaccgagtaattgctttactaatatgtagcaatccttatggtttatagAACATCCTTG
GATCAAAGGGGGAGAAGCACCGGAAAAGCCTATTGATAGCACTGTGTTATCACGTATGAAGCAATTCGAGCAAT
GAACAAGCTTAAAGAAGCTAGCCCTAAAGgtaatcacgtagctcaaaaatattatgaaattaaatctttctttatta
ctaattatgcatctcgcttatagttcttccatctctttgtgttctctaatcagttgaaacatctcatatctacta
gtgccggaacttggggatctaatttgtgtgttctgtttgcagGTTAGCGCGGTGAGTCTATCCGAAGAAGAGATC
AAAGGTCTTAAAACCTTGTTTGCGAATATGGATACCAATAGAAGCGGGACAATCACTTATGAACAACCTCCAACT
GGGCTAAGTAGACTTAGATCTAGACTCTCTGAACTGAAGTTCAGCAACTCGTTGAAGCGgtaagttatcttcag
catcttgctttctcttttccgcaattaagatcttgaaaaagacagtttgaaacacatgatgataactttttcagTC
TGATGTGGATGGTAATGGAACAATTGACTACTATGAGTTTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTCATCA
CGATGAGCAGTACACAAAGCATTCCAACACTTAGATAAAGACAAAAATGGgtaagtttcttacattttcagtg
acgaatcaatcatctttcttttttttttcaagaggattaaagattcaaatgtgtgtaactattatgaggccaaatg
ttaatgctatgttgtaatccaatagGCACATAACTAGGGATGAGTTGGAAAAGTGCCATGAAGGAATATGGAATGG
GAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCGAAGTTGACACCGACAATgtaagtcgcaactcttaacataatc
caacatctcaaacagtaaacgggtgcttgtaatgaaaccttgaaaggaactatgttacagGATGGAAAAATAAAC
TTTGAGGAATTTTCGTGCGATGATGAGATGTGGCACACACAACCAAAAGGGAAAACAGTATCCATTCACPGAcca
agactacatagatccaacggaaagtaattcttaaacatggaaaactcaaacgcagcggggcaaaaagatgaatcaa
ccaagccatcaacagattttcaacaccgtctacaaaccaatctcagttcgagatataatcaatgggagatatac
gaatggttacaaaactggacaagatgtgcaacaatacagccttcgaattcagtccttctcgcaatgaaagtcaat

atcttggagtagatgatgactgagaattggtggacatTTTTtaggctttatctccagtggaaatcatgagagaggt
 tgcgttaggtaaaattgataatgtcgcagacagatagcaatcatgagactttgtgatcacactgcttagaaagg
 ggagataagtgttttagagattagagaaatccagcgttgttcatctttggccttgcaaaataggagttccagt
 gaacacattcaagcaaaacaatgttcaggaagatggtttatatcttccagtgcttaacaatgCGGCTTgatgata
 aagattgCCGTTTataatcttcttccagagatttacagaaacctagactcaccaagagactcgttggaaagataac
 aattgatgggtcttggcacttacgggtgCGTtctgtgcagcaattaatttgagatagatctcaagtCACGCTgga
 tactttatggagattgcatataagatgatagatgaatactttatccgaagctttttgtgaatttcgcatctgatt
 tctatgaaatcgatcttctggaatgaggtaaaaaacatctcaatccgatcatgtggtttgctaattctgtcag
 agtttctctttccattggctgaaatcgataagatgaatggtagaataacaatatttggTgTgttttcgattg
 aatagctaaacaaggattcttgatttggtttaggatgattcatgaaagtttcttaggtaagagatttcaa
 tctctttgCGAattttaaggagattcaggtaaaagagattgattgaaatgTtTgTgatttccatgttctat
 tgactccaaatcgTtagtcaattgcctattgattgTtttagggatacattgtagaagaaactaggacacctatga
 ctggctttacatttttggTgctttccattgtgcagcttgcattgattaaatccctcaaggTatgcattcttTgt
 ac

Abbildung 4: Alignment der Proteinsequenz von CPK21 und CPK23
 ATP-Binderegion (grün), Aktives Zentrum (blau), EF-Handmotive =(rot)

```

cpk21      MGCFSKHRKTQNDGG-EKSIPINPVQTHVW---PEHRKPQTPPKPMTQPIHQIISTPS 56
cpk23      MGCFSKHRKTQNDGGGERSIPIIPVQTHIVDQVPDHRKPQIPSP----- 45
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      SNPVSVRDPDTILGKPFEDIRKFYSLGKELGRGQFGITYMCKEIGTGNTYACKSILKRL 116
cpk23      SIPIVSRDPETILGKPFEDIRKFYSLGRELGRGGLGITYMCKEIGTGNIYACKSILKRL 105
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      ISKQDKEDVKREIQIMQYLSGQPNIVEIKGAYEDRQSIHLMELCAGGELFDRIIAQGHY 176
cpk23      ISELGREDVKTEIQIMQHL SGQPNVVEIKGSYEDRHSVHLMELCAGGELFDRIIAQGHY 165
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      SERAAAGIIRSIVNVVQICHFMGVVHRL LKPENFLLSKEENAMLKATDFGLSVFIEEGK 236
cpk23      SERAAAGTIKSIVDVVQICHLNQVIHRL LKPENFLFSKEENAMLKVTDGFLSAFIEEGK 225
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      VYRDIVGSAYYVAPEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLSGVPPFWAENEKGFIDEVIKGE 296
cpk23      IYKDVVGSPPYYVAPEVLRQSYGKEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEEGVFVEILKCK 285
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      IDFVSEPWPSISESAKDLVRKMLTKDPKRRITAAQVLEHPWIKGGEAPDKPIDSAVLSRM 356
cpk23      IDFVREPWPSISDSAKDLVEKMLTEDPKRRITAAQVLEHPWIKGGEAPEKPIDSTVLSRM 345
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      KQFRAMNKLKLLALKVIAESLSEEEIKGLKTMFANIDTDKSGTITYEELKTGLTRLGSRL 416
cpk23      KQFRAMNKLKLLALKVSAVSLSEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQTGLSRLRSRL 405
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      SETEVKQLMEAAVDVGNGTIDYYEFISATMHRYKLDREHVYKAFQHFQDKDNSGHITRDE 476
cpk23      SETEVQQLVEASVDVGNGTIDYYEFISATMHRYKLHDEHVHKAFQHLQDKDKNGHITRDE 465
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cpk21      LESAMKEYGMGDEASIKEVI SEVDTDNDGRINFEEFCAMMRSGSTQPQGLLPFH 531
cpk23      LESAMKEYGMGDEASIKEVI SEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPQKQYPPFH 520
*****
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Abbildung 5: Expressionsdaten für CPK21 vom Arabidopsis eFP-Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca>)

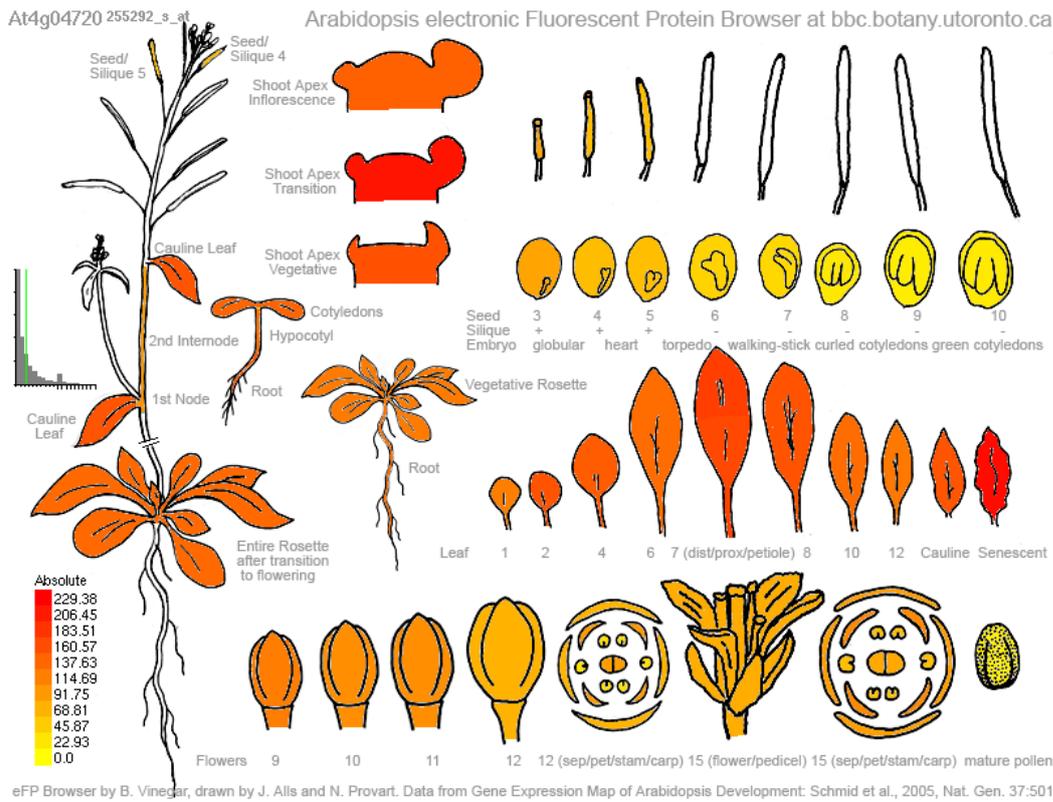
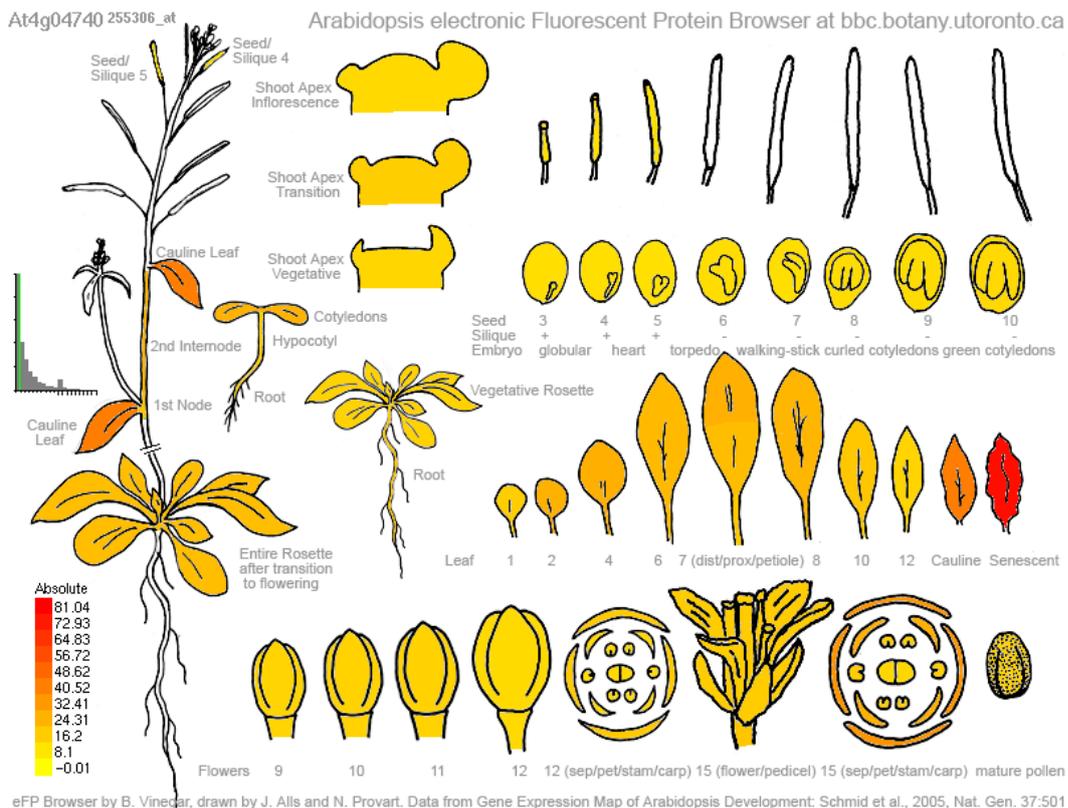


Abbildung 6: Expressionsdaten für CPK23 vom Arabidopsis eFP-Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca>)



7 Danksagung

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 stete Diskussionsbereitschaft, die mir geholfen hat, dieses interessante Projekt voranzutreiben und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auch auf internationalen Konferenzen zu präsentieren.

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

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biochemie der Pflanzen gilt mein herzlichster Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Es hat Spaß gemacht zu erleben, wie die Gruppe wächst und sich weiter entwickelt.

Allen Studierenden die ich im Rahmen einer freien Mitarbeit, Bachelor- oder Diplomarbeit betreuen durfte, danke ich für den gezeigten Einsatz für das jeweilige Projekt.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für den Spaß und die Unterstützung außerhalb des Labors bedanken.

8 Lebenslauf

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