# Molekulare und biochemische Charakterisierung der Calcium-abhängigen Protein-Kinasen CPK5 und CPK6 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

> > Ullrich Dubiella

aus Gelsenkirchen

06/2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2005 bis März 2009 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. Thomas Schmülling

Disputation am: 03.09.2009

## Inhaltsverzeichnis

| At                    | obildu | ungsve   | rzeichnis          |   | VII  |
|-----------------------|--------|----------|--------------------|---|------|
| TabellenverzeichnisIX |        |          | IX                 |   |      |
| Ak                    | okürz  | ungsv    | erzeichnis         |   | X    |
| Zι                    | Isam   | menfas   | sung/Sun           | nmary   | XIII |
| 1                     | Einl   | leitung  |                    |   |      |
|                       | 1.1    | Pflanze  | -Pathogen-I        | Interaktion                                       | 1    |
|                       |        | 1.1.1    | Nichtwirts         | spezifische Immunität (Angeborene Immunität)      | 2    |
|                       |        |          | 1.1.1.1 F          | Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs)    | 3    |
|                       |        |          | 1.1.1.2 N          | Mustererkennende Rezeptoren                       | 5    |
|                       |        |          | 1.1.1.3 \$         | Signaltransduktion nach PAMP-Erkennung            | 6    |
|                       |        | 1.1.2    | Effektorpro        | oteine und wirtsspezifische Immunität             | 7    |
|                       |        | 1.1.3    | Calcium al         | s Signalmolekül                                   | 8    |
|                       |        | 1.1.4    | Calcium-al         | bhängige Protein-Kinasen (CDPKs)                  | 9    |
|                       |        |          | 1.1.4.1 \$         | Struktureller Aufbau von CDPKs                    | 10   |
|                       |        |          | 1.1.4.2 H          | Biochemische Aktivierung von CDPKs                | 11   |
|                       |        |          | 1.1.4.3 H          | Biologische Funktion von CDPKs                    | 13   |
|                       |        |          | 1.1.4.4 0          | CDPKs und Pathogenabwehr                          | 14   |
|                       | 1.2    | Ziel de  | r Arbeit           |   | 16   |
| 2                     | Mate   | erial ur | d Method           | en  | 17   |
|                       | 2.1    | Materi   | al                 |   | 17   |
|                       |        | 2.1.1    | Chemikalie         | en  | 17   |
|                       |        | 2.1.2    | Nährmedie          | en  | 17   |
|                       |        | 2.1.3    | Verwendet          | e Bakterien- und Pilzstämme                       | 18   |
|                       |        | 2.1.4    | Verwendet          | es Pflanzenmaterial                               | 19   |
|                       | 2.2    | Pflanze  | nanzucht.          |   | 20   |
|                       | 2.3    | Anzuc    | nt von <i>Esch</i> | erichia coli, Pseudomonas syringae pv. tomato und |      |
|                       |        | Agroba   | cterium tun        | nefaciens   | 20   |
|                       | 2.4    | Transfe  | ormationen         |   | 21   |

|     | 2.4.1   | Herstellung chemo-kompetenter Escherichia coli                       | 21 |
|-----|---------|--|----|
|     | 2.4.2   | Herstellung elektro-kompetenter Agrobacterium tumefaciens            | 21 |
|     | 2.4.3   | Transformation von Plasmid-DNA in Escherichia coli                   | 22 |
|     | 2.4.4   | Transformation von Plasmid-DNA in Agrobacterium tumefaciens          | 22 |
|     | 2.4.5   | Stabile Transformation von Arabidopsis thaliana Col-0 mittels        |    |
|     |         | Agrobacterium tumefaciens  | 22 |
| 2.5 | DNA-A   | Analytik   | 23 |
|     | 2.5.1   | Verwendete Plasmide  | 23 |
|     | 2.5.2   | Isolation genomischer DNA aus Pflanzen                               | 25 |
|     |         | 2.5.2.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen nach Ed-              |    |
|     |         | warts et al  | 25 |
|     | 2.5.3   | Plasmid-Minipräparation aus <i>E. coli</i>                           | 26 |
|     | 2.5.4   | Agrobakterium Plasmid-Minipräparation                                | 26 |
|     | 2.5.5   | Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration                             | 27 |
|     | 2.5.6   | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)                                     | 27 |
|     |         | 2.5.6.1 Genotypisierung  | 27 |
|     |         | 2.5.6.2 Klonierung mit dem Gateway-System <sup>TM</sup>              | 28 |
|     |         | 2.5.6.3 Reverse Transkription  | 28 |
|     | 2.5.7   | Agarosegelelektrophorese   | 28 |
|     | 2.5.8   | Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen                        | 29 |
|     | 2.5.9   | Restriktionsverdau   | 29 |
|     | 2.5.10  | Zielgerichtete Mutagenese  | 29 |
|     | 2.5.11  | Sequenzierung der DNA  | 30 |
|     | 2.5.12  | Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung                           | 30 |
| 2.6 | RNA-A   | Analytik   | 30 |
|     | 2.6.1   | Isolierung von RNA aus Pflanzen                                      | 30 |
|     | 2.6.2   | DNAse-Verdau isolierter RNA  | 30 |
| 2.7 | Protein | nanalytik  | 31 |
|     | 2.7.1   | Proteinexpression  | 31 |
|     |         | 2.7.1.1 Transiente Proteinexpression in <i>Nicotiana benthamiana</i> | 31 |
|     |         | 2.7.1.2 Proteinreinigung StrepII-markierter Proteine nach Ex-        |    |
|     |         | pression in Nicotiana benthamiana (Witte et al., 2004)               | 31 |
|     |         | 2.7.1.3 Transiente Proteinexpression in Arabidopsis thaliana-        |    |
|     |         | Mesophyllprotoplasten (Yoo et al. 2007)                              | 32 |

|     |        | 2.7.1.4     | Proteinreinigung StrepII-markierter Proteine nach Ex-  |    |
|-----|--------|-------------|--|----|
|     |        |             | pression in Arabidopsis thaliana-Mesophyllprotoplasten | 33 |
|     | 2.7.2  | Konzent     | rationsbestimmung von Proteinen                        | 33 |
|     | 2.7.3  | SDS-Pol     | yacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)                    | 33 |
|     | 2.7.4  | Proteinfä   | ärbung mit Coomassie                                   | 33 |
|     | 2.7.5  | Western     | -Blot  | 34 |
|     |        | 2.7.5.1     | Immunodetektion StrepII-markierter Proteine            | 34 |
|     |        | 2.7.5.2     | Immunodetektion phosphorylierter MAP-Kinasen (TxY-     |    |
|     |        |             | Western)   | 34 |
|     |        | 2.7.5.3     | Immunodetektion myc-markierter Proteine                | 35 |
|     |        | 2.7.5.4     | Identifizierung von in vivo Phopshorylierungsstellen . | 35 |
|     |        | 2.7.5.5     | Phosphatase-Behandlung                                 | 36 |
|     | 2.7.6  | Kinaseal    | ktivitätstest  | 36 |
|     |        | 2.7.6.1     | In-Gel-Kinase-Test                                     | 36 |
|     | 2.7.7  | Fluoresz    | ensmikroskopie   | 37 |
|     | 2.7.8  | Färbung     | von Protoplasten mit FDA und PI                        | 37 |
|     | 2.7.9  | Histoche    | mische Färbung der Glucuronidase-Aktivität             | 38 |
| 2.8 | Phäno  | typische A  | Analysen   | 38 |
|     | 2.8.1  | Pathogen    | n-Tests <i>in planta</i>                               | 38 |
|     |        | 2.8.1.1     | Alternaria brassicicola Infektion                      | 38 |
|     |        | 2.8.1.2     | Bakterienwachstumsversuche mit Pseudomonas sy-         |    |
|     |        |             | ringae pv. tomato                                      | 38 |
| Erg | ebniss | е           |  | 40 |
| 3.1 | Genot  | ypische A   | nalyse der verwendeten Arabidopsis-Mutanten            | 40 |
| 3.2 | Expres | ssionsanal  | ysen für <i>AtCPK5</i> und <i>AtCPK6</i>               | 43 |
|     | 3.2.1  | Expressi    | onsanalysen nach Pathogenstress                        | 46 |
| 3.3 | Subze  | lluläre Lol | kalisation von <i>At</i> CPK5 und <i>At</i> CPK6       | 48 |
| 3.4 | Bioche | emische A   | nalysen von AtCPK5 und AtCPK6                          | 50 |
|     | 3.4.1  | Transien    | te Proteinexpression und Flg22-Behandlung in N. bent-  |    |
|     |        | hamiana     | 1  | 50 |
|     | 3.4.2  | Transien    | te Proteinexpression in Mesophyll-Protoplasten von     |    |
|     |        | Arabido     | psis thaliana  | 53 |
|     | 3.4.3  | Elizitien   | ung mit Flg22 nach Expression in Arabidopsis-          |    |
|     |        | Mesophy     | yll-Protoplasten                                       | 54 |
|     |        | 3.4.3.1     | Induktion der Kinaseaktivität durch Elizitierung       | 55 |

3

|    |       | 3.4.4         | Untersuchungen von gain-of-function-Varianten                   | 58  |  |  |
|----|-------|---------------|---|-----|--|--|
|    |       |               | 3.4.4.1 Wechselwirkung mit MAP-Kinasen                          | 60  |  |  |
|    |       | 3.4.5         | Charakterisierung und Identifizierung von Phosphorylierungs-    |     |  |  |
|    |       |               | stellen in <i>At</i> CPK5                                       | 61  |  |  |
|    | 3.5   | Patho-        | physiologische Untersuchungen der Atcpk6-Mutante                | 63  |  |  |
|    |       | 3.5.1         | Infektion mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato            | 63  |  |  |
|    |       | 3.5.2         | Infektion mit Alternaria brassicicola                           | 65  |  |  |
|    |       | 3.5.3         | Untersuchung der Calciumströme nach Flg22-Behandlung in At-     |     |  |  |
|    |       |               | <i>cpk6</i> -KO-Pflanzen  | 65  |  |  |
|    | 3.6   | Phäno         | tyische Analyse 35S: <i>At</i> CPK5-YFP exprimierender Pflanzen | 67  |  |  |
|    |       | 3.6.1         | Markergenanalysen 35S:AtCPK5-YFP exprimierender Pflanzen        | 67  |  |  |
|    |       | 3.6.2         | Proteinexpression   | 69  |  |  |
|    |       | 3.6.3         | Infektion mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>     | 70  |  |  |
| 4  | Dis   | iskussion     |   |     |  |  |
|    | 4.1   | Expres        | ssion und Lokalisierung von <i>At</i> CPK5 und <i>At</i> CPK6   | 73  |  |  |
|    |       | 4.1.1         | Gewebespezifische Expression                                    | 73  |  |  |
|    |       | 4.1.2         | Subzelluläre Lokalisierung                                      | 74  |  |  |
|    |       | 4.1.3         | Pathogen-induzierte Expression                                  | 75  |  |  |
|    | 4.2   | Patho-        | physiologische Untersuchungen der Atcpk6-Mutanten               | 76  |  |  |
|    | 4.3   | Bioche        | emische Aktivierung nach Elizitierung                           | 78  |  |  |
|    |       | 4.3.1         | Auswirkung konstitutiv aktiver CPKs                             | 80  |  |  |
|    |       | 4.3.2         | Einfluss von CPKs auf die Aktivierung von pathogen-induzierten  |     |  |  |
|    |       |               | MAPK  | 82  |  |  |
|    | 4.4   | Identif       | fizierung und Charakterisierung von Phosphorylierungsstellen in |     |  |  |
|    |       | <i>At</i> CPk | κ5  | 84  |  |  |
|    | 4.5   | Phäno         | typische Untersuchungen von AtCPK5-YFP Überexpressionslinien    | 86  |  |  |
|    | 4.6   | Funkti        | on von AtCPK5 und AtCPK6 in der Pathogenabwehr                  | 88  |  |  |
|    | 4.7   | Ausbli        |   | 92  |  |  |
| Li | terat | ur            |   | 93  |  |  |
| 5  | Δnk   | ang           |   | 102 |  |  |
| 5  |       | ung           |   | 100 |  |  |

## Abbildungsverzeichnis

| Verwandtschaftsverhältnisse von CDPKs aus Arabidopsis thaliana       | 10  |
|--|---|
| Allgemeine Domänenstruktur von CDPKs                                 | 11  |
| Aktivierungsmodell für CDPKs   | 12  |
| Genstruktur und Genotypisierung der verwendeten Mutantenlinien       | 42  |
| Genevestigator-Analyse der Genexpression von AtCPK5 und AtCPK6 .     | 43  |
| GUS-Färbung von Pcpk5:GUS exprimierenden Arabidopsis thaliana-       |   |
| Pflanzen   | 44  |
| GUS-Färbung von Pcpk6:GUS exprimierenden Arabidopsis thaliana-       |   |
| Pflanzen   | 45  |
| Expressions analyse von AtCPK5 und AtCPK6 nach Infektion mit Pseu-   |   |
| domonas syringae pv. tomato  | 46  |
| Microarray-Analysen der AtCPK5 und AtCPK6 Expression nach Inoku-     |   |
| lation von verschiedenen Elizitoren                                  | 47  |
| Subzelluläre Lokalisation von <i>At</i> CPK5                         | 48  |
| Subzelluläre Lokalisation von <i>At</i> CPK6                         | 49  |
| In vitro-Kinase-Test nach transienter Expression von AtCPK5 und      |   |
| AtCPK6 in N. benthamiana und nach Flg22-Behandlung                   | 51  |
| In-Gel-Kinase-Test von StrepII-markierter AtCPK5 nach Expression in  |   |
| <i>N. benthamiana</i> und Flg22 bzw. <i>Pst</i> DC3000 Infiltration  | 52  |
| Fluoreszenzmikroskopie von YFP-exprimierenden A. thaliana Mesophyll- |   |
| Protoplasten   | 53  |
| Western-Blot gegen StrepII-markierte AtCPK5 und AtCPK6 nach Ex-      |   |
| pression in Arabidopsis-Protoplasten                                 | 54  |
| Phosphatase-Behandlung von StrepII-markiertem AtCPK5                 | 55  |
| In-Gel-Kinase-Test nach Flg22-Behandlung                             | 56  |
| Zeitlicher Ablauf der Aktivierung von AtCPK5 durch Flg22             | 56  |
| Flg22-spezifische Induktion der AtCPK5-Phosphorylierung              | 57  |
| Ko-Transfektion der AtCPK5 VK mit AtAAH und AvrPto                   | 58  |
| FDA/PI-Färbung von transfizierten Protoplasten                       | 59  |
|  | Verwandtschaftsverhältnisse von CDPKs aus Arabidopsis thalianaAllgemeine Domänenstruktur von CDPKsAktivierungsmodell für CDPKsAktivierungsmodell für CDPKsGenstruktur und Genotypisierung der verwendeten MutantenlinienGenevestigator-Analyse der Genexpression von AtCPK5 und AtCPK6GUS-Färbung von $P_{cpk5}$ :GUS exprimierenden Arabidopsis thaliana-PflanzenGUS-Färbung von $P_{cpk6}$ :GUS exprimierenden Arabidopsis thaliana-PflanzenSupressionsanalyse von AtCPK5 und AtCPK6 nach Infektion mit Pseu-domonas syringae pv. tomatoMicroarray-Analysen der AtCPK5 und AtCPK6 Expression nach Inoku-lation von verschiedenen ElizitorenSubzelluläre Lokalisation von AtCPK5Subzelluläre Lokalisation von AtCPK6In vitro-Kinase-Test nach transienter Expression von AtCPK5 undAtCPK6 in N. benthamiana und nach Flg22-BehandlungIn-Gel-Kinase-Test von StrepII-markierter AtCPK5 nach Expression inN. benthamiana und Flg22 bzw. Pst DC3000 InfiltrationFluoreszenzmikroskopie von YFP-exprimierenden A. thaliana Mesophyll-ProtoplastenPhosphatase-Behandlung von StrepII-markierte AtCPK5 und AtCPK6 nach Expression inArabidopsis-ProtoplastenPhosphatase-Behandlung von StrepII-markiertem AtCPK5In-Gel-Kinase-Test nach Flg22-BehandlungCitlicher Ablauf der Aktivierung von AtCPK5 durch Flg22In-Gel-Kinase-Test nach Flg22-BehandlungCitlicher Ablauf der Aktivierung von AtCPK5 durch Flg22Flg22-spezifische Induktion der AtCPK5-PhosphorylierungZeitlicher Ablauf der Aktivierung von AtCPK5 durch Flg22Flg22-spe |

| 3.19 | MAP-Kinase-Aktivierung nach Flg22-Behandlung in Abhängigkeit von     |     |
|------|--|-----|
|      | der Expression verschiedener CPKs                                    | 60  |
| 3.20 | Untersuchung zur Auswirkung von Autophosphorylierungsstellen in vivo | 62  |
| 3.21 | Phänotypischer Vergleich der Atcpk6-Mutante mit dem Col-0 WT nach    |     |
|      | Infektion mit <i>Pst</i> DC3000                                      | 63  |
| 3.22 | Bakterienwachstum von Pst DC3000, AvrRpm1 und hrcC- in Atcpk6-       |     |
|      | Mutanten im Vergleich zum Col-0 WT                                   | 64  |
| 3.23 | Phänotypischer Vergleich der Atcpk6-Mutante mit dem Col-0 WT nach    |     |
|      | Infektion mit Alternaria brassicicola                                | 65  |
| 3.24 | Messung der cytosolischen Calciumkonzentration in Atcpk6-KO Pflan-   |     |
|      | zen nach Flg22-Behandlung  | 66  |
| 3.25 | Phänotyp 35S: <i>At</i> CPK5-YFP exprimierender Pflanzen             | 67  |
| 3.26 | Phänotyp und RT-PCR-Analyse von AtCPK5-YFP exprimierenden            |     |
|      | Pflanzen   | 68  |
| 3.27 | YFP-spezifischer Proteinnachweis der AtCPK5-YFP exprimierenden       |     |
|      | Pflanzen   | 69  |
| 3.28 | Phänotypischer Vergleich der AtCPK5-YFP exprimierenden Pflanzen      |     |
|      | mit Col-0 WT nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000 und $hrcC^{-}$     | 70  |
| 41   | Modell der MAPK- und CPK-abhängigen Signaltransduktion nach          |     |
| 7,1  | PAMP-Frkenning   | 89  |
|      |  | 07  |
| 5.1  | Clustal-W Alignment der Aminosäuresequenz von AtCPK5 und AtCPK6      | 108 |
| 5.2  | Genomische Sequenz von At4g35310 ( <i>AtCPK5</i> )                   | 109 |
| 5.3  | Genomische Sequenz von At2g17290 ( <i>AtCPK6</i> )                   | 110 |
| 5.4  | pXCSG-StrepII Vektoren   | 114 |
| 5.5  | pXCSG-YFP Vektoren   | 115 |
| 5.6  | pXCSG-GUS Vektoren   | 115 |

## Tabellenverzeichnis

| 0.1 | Abkürzungen der Aminosäuren   | XII |
|-----|---|-----|
| 0.2 | Abkürzungen der organischen Basen                                   | XII |
| 2.1 | Verwendete Nährmedien   | 18  |
| 2.2 | Verwendete Antibiotika und deren Arbeitskonzentrationen             | 18  |
| 2.3 | Verwendete Bakterienstämme  | 19  |
| 2.4 | Verwendeter Wildtyp   | 20  |
| 2.5 | Verwendete Knock-out-Linien   | 20  |
| 2.6 | Verwendete Vektoren   | 23  |
| 2.7 | Überexpressionskonstrukte für <i>At</i> CPK5 und <i>At</i> CPK6     | 24  |
| 2.8 | Plasmide zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression sowie   |     |
|     | intrazellulärer Lokalisation von <i>At</i> CPK5 bzw. <i>At</i> CPK6 | 25  |
| 3.1 | Identifizierte Phosphorylierungen von AtCPK5 nach Flg22-Behandlung  | 62  |
| 5.2 | Mutageneseprimer  | 111 |
| 5.1 | Primer zur Genotypisierung  | 111 |
| 5.3 | Klonierungsprimer   | 112 |
| 5.4 | Primer für RT-PCRs  | 113 |

## Abkürzungsverzeichnis

| ABA            | Abscisinsäure  |
|----------------|--|
| Abb.           | Abbildung  |
| AEBSF          | 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid                         |
| AP             | Alkalische Phosphatase   |
| APS            | Ammoniumpersulfat  |
| At             | Arabidopsis thaliana   |
| ATP            | Adenosin-triphosphat   |
| Avr            | Avirulenzfaktor  |
| A. thaliana    | Arabidopsis thaliana   |
| A. tumefaciens | Agrobacterium tumefaciens                                      |
| BASTA          | Glufosinat-Ammonium  |
| BCIP           | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat                               |
| BAK1           | BRI1-associated Kinase 1                                       |
| bp             | Basenpaare   |
| BSA            | Rinder Serum Albumin   |
| ca.            | circa  |
| CBL            | Calcineurin B-ähnliches Protein                                |
| cDNA           | komplementäre DNA  |
| CDPK           | Calcium-abhängige Protein-Kinase                               |
| СРК            | Calcium-abhängige Protein-Kinase (Nomenklatur für A. thaliana) |
| CIPK           | CBL-interagierende Protein-Kinase                              |
| CLD            | Calmodulin-like Domain   |
| Col-0          | Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia-0                         |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure   |
| EFR            | Elongationsfaktor-Tu Rezeptor                                  |
| EF-Tu          | Elongationsfaktor Tu   |
| FDA            | Fluoresceindiacetat  |
| FLS2           | Flagellin-Sensing 2  |
| fw             | forward  |

| HR                | hypersensitive Reaktion                                      |
|-------------------|--|
| HRP               | Meerettichperoxidase   |
| kDa               | Kilodalton   |
| KO                | Knock out  |
| LC-MS             | Flüssigchromatographie - Massenspektroskopie                 |
| LPS               | Lipopolysaccharid  |
| LRR               | leucin-rich repeat   |
| MAPK/MPK          | Mitogen activated protein kinase                             |
| mRNA              | Boten Ribonukleinsäure                                       |
| min               | Minute(n)  |
| Nt                | Nicotiana tabacum  |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte bei 600 nm                                   |
| PAGE              | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                              |
| PAMP              | pathogen-associated molecular pattern                        |
| PCR               | polymerase-chain reaction                                    |
| Pfu               | Pyrococcus furiosus  |
| PI                | Prodiumiodid   |
| PR                | pathogenesis-related   |
| Pst               | Pseudomonas syringae pv. tomato                              |
| rev               | revers   |
| R-Gen             | Resistenzgen   |
| RLK               | Rezeptor-ähnliche Kinasen                                    |
| RPM1              | Resistent gegenüber Pseudomonas syringae pv. maculicula 1    |
|                   | (identisch mit RPS3)   |
| RT-PCR            | reverse Transkription mit anschließender PCR                 |
| SA                | Salicylsäure   |
| SAR               | systemisch erworbene Resistenz                               |
| SDS               | Natrium-Dodecyl-Sulfat                                       |
| Tab.              | Tabelle  |
| U                 | Unit   |
| upm               | Umdrehungen pro Minute                                       |
| -VK               | konstitutiv aktive CDPK bestehend aus Variabler- und Kinase- |
|                   | Domäne   |
| WT                | Wildtyp  |
| YFP               | gelb fluoreszierendes Protein                                |

| Aminosäure     | Dreibuch-<br>stabenkode | Einbuch-<br>stabenkode | Aminosäure | Dreibuch-<br>stabenkode | Einbuch-<br>stabenkode |
|----------------|-------------------------|------------------------|------------|-------------------------|------------------------|
| Alanin         | Ala                     | A                      | Methionin  | Met                     | М                      |
| Cystein        | Cys                     | C                      | Asparagin  | Asn                     | Ν                      |
| Asparaginsäure | Asp                     | D                      | Prolin     | Pro                     | Р                      |
| Glutaminsäure  | Glu                     | E                      | Glutamin   | Gln                     | Q                      |
| Phenylalanin   | Phe                     | F                      | Arginin    | Arg                     | R                      |
| Glycin         | Gly                     | G                      | Serin      | Ser                     | S                      |
| Histidin       | His                     | Н                      | Threonin   | Thr                     | Т                      |
| Isoleucin      | Ile                     | Ι                      | Valin      | Val                     | V                      |
| Lysin          | Lys                     | K                      | Tryptophan | Trp                     | W                      |
| Leucin         | Leu                     | L                      | Tyrosin    | Tyr                     | Y                      |

### Tabelle 0.1 Abkürzungen der Aminosäuren

## Tabelle 0.2 Abkürzungen der organischen Basen

|   | Purine |   | Pyrimidine |
|---|--------|---|------------|
| Α | Adenin | C | Cytosin    |
| G | Guanin | Т | Thymin     |

### Zusammenfassung

Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs) sind Ser/Thr Protein-Kinasen bei denen die Calcium-bindende Sensordomäne mit einer Kinase-Effektordomäne in einem Molekül vereint ist. Sie werden als wichtige Regulatoren bei einer Vielzahl von unterschiedlichsten Prozessen diskutiert und übersetzen umweltbedingte cytoplasmatische Calciumsignale in definierte Phosphorylierungsmuster.

Bislang gab es nur wenige Hinweise auf eine Beteiligung von CDPKs an der R-Genvermittelten Pathogenabwehr in Tabak (Romeis et al., 2000; Romeis et al., 2001; Ludwig et al., 2005; Kobayashi et al., 2007) bzw. sehr wenige Hinweise auf die Regulation der PAMP-vermittelten Abwehr in Gerste (Freymark et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden nahesten verwandten CDPKs CPK5 und CPK6 aus *Arabidopsis thaliana* innerhalb der PAMP-induzierten Signaltransduktion untersucht. Die hier vorgelegten Daten deuten zum ersten mal auf eine direkte Verbindung zwischen Calcium-abhängigen Protein-Kinasen aus *Arabidopis thaliana* und der Regulation der frühen PAMP-induzierten Pathogenabwehr hin. Biochemische Untersuchungen an transient in *Arabidopsis thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimierten *At*CPK5- und *At*CPK6-Protein konnten zeigen, dass diese Kinasen eine durch Flg22 und Elf18 spezifische induzierbare Kinaseaktivität aufweisen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *At*CPK5 stressabhängig phosphoryliert wird. Eine wichtige Phosphorylierungsstelle scheint dabei die Aminosäure S8 zu sein. Mutationen an dieser Stelle führen zu einem Protein, dass Flg22 insensitiv ist. Zudem konnten in dieser Arbeit weitere Flg22 abhängige *in vivo* Phosphorylierungsstellen identifiziert werden.

Die Expression der konstitutiv aktiven Variante der *At*CPK5 in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten führt, ähnlich wie nach Expression in *N. benthamiana*, zum Absterben der Zellen. Darüber hinaus verursacht dieses Protein eine Reduktion der Phosphorylierung von *At*MPK3 und *At*MPK6 nach Flg22 Behandlung.

Da keine KO-Mutanten für *AtCPK5* zur Verfügung standen, konnten die pathophysiologischen Untersuchungen nur mit der *At*cpk6-KO-Mutante durchgeführt werden. Hier zeigten sich jedoch keine Unterschiede zum Col-0 WT. Im Gegensatz dazu weisen *At*CPK5-YFP überexprimierende Pflanzen einen interessanten Phänotyp auf. An den Blatträndern entwickeln sich ohne Pathogenbefall chlorotische und nekrotische Bereiche und RT-PCR-Analysen konnten zeigen, dass die Expression von pathogenabwehr relevanten Salicylsäure-abhängigen Markergenen erhöht ist.

### Summary

Calcium-dependent protein kinases (CDPK) are a class of serine/threonine kinases, in which the calcium-binding sensor domain is linked to the protein kinase effector domain within one molecule. CDPKs have been identified as major signaling mediators, which translate changes in the environment into specific phosphorylation signals.

A direct involvement of CDPKs in plant defence has so far only been shown in a genfor-gen interaction in tobacco (Romeis et al., 2000; Romeis et al., 2001; Ludwig et al., 2005; Kobayashi et al., 2007) and there are some evidences that CDPKs might play a role in PAMP induced defence responses in barley (Freymark et al., 2007).

This thesis adresses the function of two close homologues CPK5 and CPK6 from *Ara-bidopsis thaliana* in the PAMP induced signal transduction. Results indicate for the first time a direct link between CDPKs from *Arabidopsis thaliana* and the regulation of very early PAMP induced defence responses. Biochemical experiments with Protein transient-ly expressed in *Arabidopsis thaliana* mesophyll-protoplasts showed a Flg22 and Elf18 specific inducible kinase activation.

The induction of kinase activity is linked to a change in the phosphorylation status of *At*CPK5. An important phosphorylation site involved is a Serin at position 8. Site-directed mutation of S8 results in a Flg22 insensitive protein. In addition, new additional Flg22-dependent *in vivo*-phosphorylation sites were identified.

Similar to results from *N. benthamiana* the expression of constitutive-active variants of *At*CPK5 in mesophyll-protoplast from *Arabidopsis* resulted in enhanced cell death symptoms. Also a reduction of Flg22 induced phosphorylation of *At*MPK3 and *At*MPK6 could be observed.

Since there had been no knock-out lines available for *AtCPK5* all phytopathological test were performed only with *Atcpk6* knock-out plants. No differences between *Atcpk6* and the Col-0 WT plants could be detected. In contrast *At*CPK5-YFP overexpressing plants developed chlorotic and necrotic lesions without any infection by pathogens. Furthermore RT-PCRs demonstrated an enhanced expression of pathogen-induced marker gens indicative for the salicylic acid dependent pathway.

## 1 Einleitung

Pflanzenkrankheiten sind in der heutigen Zeit der Monokulturen ein wichtiges Thema und großes Problem (Strange und Scott, 2005). Ein Pathogen, das einmal erfolgreich eingedrungen ist, kann sich rasant vermehren und zu erheblichen Ertragseinbußen führen. So war das Schadenpotential von Pilzen und Bakterien beim Weizenanbau in West-Europa in den Jahren 1996-1998 genau so groß wie das von Unkräutern, die gemeinhin für die größten Ernteverluste verantwortlich sind (Örke und Dehen, 2004).

Phytopathogene können aber auch eine Gefährdung des Menschen darstellen. Der im Deutschen auch Mutterkorn genannte Pilz *Claviceps purpurea* befällt vor allem Roggen und andere Getreidearten und produziert für den Menschen giftige Alkaloide, wie beispielsweise Ergotamin. Diese können zu Magenkrämpfen, Halluzinationen und dem Absterben von Fingern und Zehen führen (Creutzig und Alexander, 1985). Vor allem im Mittelalter kam es nach dem Verzehr von verseuchtem Getreide häufig zu Epidemieartigen Vergiftungen ganzer Dörfer und Städte. Die letzten größeren Fälle von Mutterkornvergiftungen sind aus Frankreich (1953) und Äthiopien (1978) berichtet worden (Murphy et al., 2006).

Um die von Pathogenen verursachten Ertragseinbußen und Gefährdungen des Menschen zu reduzieren, werden in der modernen Landwirtschaft vermehrt Pflanzenschutzmittel eingesetzt. So stieg in Deutschland der Absatz an Fungiziden von 1991 bis 2007 um mehr als 29% (Daten des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit). Allerdings werden Pflanzenschutzmittel, insbesondere Pestizide, kritisch diskutiert, da sie im Verdacht stehen Krebs zu erzeugen (Infante-Rivard und Weichenthal, 2007; Andreotti et al., 2008). Darüber hinaus können Pathogene Resistenzen gegenüber den eingesetzten Mitteln entwickeln und diese so wirkungslos machen. Daher ist es sinnvoll, zu verstehen, wie Pflanzen Pathogene erkennen und abwehren. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse lassen sich dann eventuell Pflanzen züchten, die eine auf natürlichem Wege erworbene erhöhte Pathogenresistenz besitzen und so helfen, den Einsatz von Pestiziden zu reduzieren.

#### 1.1 Pflanze-Pathogen-Interaktion

Aufgrund ihrer Lebensweise kann man phytopathogene Organismen in drei Gruppen unterteilen. Die erste besteht aus nekrotrophen Pathogenen, welche ihre Wirtszelle/-pflanze nach Befall töten und sich dann von dem abgestorbenen Material ernähren. Zu dieser Gruppe zählen z. B. die Pilze *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*. Um die befallene Pflanze zu töten, sekretieren sie eine Reihe von toxischen Sekundärmetaboliten, die die Wirtszellen entweder direkt töten oder in ihnen Apoptose auslösen.

Die zweite Gruppe, die der biotrophen Pathogene, ist dadurch gekennzeichnet, dass diese Organismen auf lebende Wirtszellen angewiesen sind um ihren Lebenszyklus abzuschließen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem der Mehltau verursachende Pilz *Blumeria graminis* und Rostpilze (z. B. der Gattung *Puccinia*).

Die dritte Gruppe ist die der hemibiotrophen Pathogene. Diese Organismen verhalten sich in den ersten Infektionsstadien wie biotrophe Pathogene und ernähren sich von der lebenden Wirtszelle. Im weiteren Verlauf der Infektion töten sie jedoch ihren Wirt und nutzen, wie nekrotrophe Pathogene, die abgestorbenen Überreste als Nährstoffquelle. Zu dieser Gruppe zählen zum Beispiel die Gram-negativen Bakterien der Gattung *Pseudo-monas syringae*, Verursacher der Tüpfelschwärze bei Tomaten und der Fettfleckenkrankheit bei Hülsenfrüchten.

#### 1.1.1 Nichtwirtsspezifische Immunität (Angeborene Immunität)

Wie alle multizellulären Organismen sind Pflanzen einer Vielzahl von potentiellen Pathogenen ausgesetzt. Dennoch gilt für die meisten Pflanze-Pathogen-Interaktionen, dass komplette Pflanzenarten gegenüber bestimmten Pathogenspezies resistent sind. Sie bieten den Pathogenen keine Grundlage, Nährstoffe zu beziehen und ihren Lebenszyklus abzuschließen. Diese Form der Resistenz wird auch als nichtwirtsspezifische Immunität, Basisresistenz oder Basisinkompatibilität bezeichnet (Heath, 2000b; Nürnberger et al., 2004).

Die meisten Pathogene scheitern daran in die Pflanze einzudringen, da diese konstitutiv vorhandene Schutzmechanismen besitzen. Zum einen besitzen Pflanzen rein mechanische Barrieren, wie die äußere Wachsschicht (Cuticula), die die Blätter an der Außenseite überzieht oder die feste Zellwand, die alle Pflanzenzellen umgibt. Des Weiteren können konstitutiv vorhandene antimikrobielle Substanzen, zum Beispiel Saponine und Phenylpropane, viele Pathogene an einer erfolgreichen Proliferation hindern (Maher et al., 1994; Papadopoulou et al., 1999). Ist ein Pathogen nicht in der Lage diese Barrieren zu überwinden, sind keine weiteren Abwehrmaßnahmen seitens der Pflanze notwendig, um einen Krankheitsausbruch zu verhindern.

Reichen diese permanent vorhandenen Barrieren allerdings nicht aus, um eine Resistenz gegenüber dem Pathogen zu determinieren, besitzen Pflanzen zusätzliche, induzierbare Abwehrmechanismen. Nach Pathogenbefall wird unter anderem die Synthese von niedermolekularen Stoffen induziert, die eine antimikrobielle Wirkung aufweisen und als Phytoalexine bezeichnet werden (Flors und Nonell, 2006; Lecourieux et al., 2006). So ist beispielsweise der nekrotrophe Pilz *Alternaria brassicicola* normalerweise nicht in der Lage, seinen Lebenszyklus auf *Arabidopsis thaliana* abzuschließen und Sporen zu bilden. Ist die Bildung der Phytoalexine jedoch gestört, wie in den *phytoalexin-defizienten* (*pad*) Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, erhöht sich die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber *Alternaria brassicicola*, der auf der *pad3-1* Mutante sogar Sporen bilden kann (Thomma et al., 1999).

Um aber ein wie oben beschriebenes induzierbares System nutzen zu können, müssen Pflanzen erkennen können, wann sie von einem Pathogen attackiert werden. Daher ist der erste Schritt einer erfolgreichen Abwehr von mikrobiellen Infektionen, sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen, die Erkennung von körperfremden Stoffen bzw. Organismen. In tierischen Systemen wie der Maus, dem Menschen oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist über diese Art des Immunsystems viel bekannt (Palm und Medzhitov, 2009; Medzhitov und Janeway, 2002). Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Entschlüsselung der pflanzlichen Basalabwehr gemacht wurden (Asai et al., 2002; Gomez-Gomez und Boller, 2002; Gohre und Robatzek, 2008; Wan et al., 2008; Zipfel, 2008), ist dieses Wissen, im Vergleich zum tierischen Immunsystem, immer noch verschwindend gering.

#### 1.1.1.1 Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs)

Neben den offensichtlichen Unterschieden zwischen dem tierischen und pflanzlichen Immunsystem, wie etwa dem Fehlen eines adaptiven Immunsystems mit der Bildung von Antikörpern, das bei Tieren eng mit dem angeboren Immunsystem verknüpft ist, oder dem Fehlen von spezialisierten Zelltypen (z. B. Makrophagen), die für die Erkennung von Pathogenen in Tieren verantwortlich sind (Palm und Medzhitov, 2009), gibt es auf molekularer Ebene erstaunliche mechanistische und strukturelle Ähnlichkeiten (Nürnberger et al., 2004; Zipfel und Felix, 2005).

Sowohl in Pflanzen als auch bei Tieren zeichnet sich die basale Immunität durch die Erkennung von so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) aus (Ja-

neway und Medzhitov, 2002; Medzhitov und Janeway, 2002). PAMPs werden auch als generelle Elizitoren bezeichnet und definieren sich durch drei Merkmale.

Zum ersten werden PAMPs nur von Mikroorganismen gebildet und es spielt dabei keine Rolle, ob diese Mikroben für den jeweiligen Organismus Pathogene darstellen oder nicht. Durch diesen Umstand kann das Immunsystem von Pflanzen und Tieren zwischen "selbst" und "nicht-selbst" unterscheiden. Zum zweiten zeichnen sich PAMPs durch einen hohen Grad der Konservierung innerhalb einer bestimmten Gruppe von Mikroorganismen aus. Hierdurch kann mit einer relativ geringen Anzahl von Rezeptoren ein breites Spektrum von mikrobiellen Infektionen erkannt werden. Und drittens sind PAMPs essentiell für das Überleben der jeweiligen Mikroorganismen. Mutationen oder ein Verlust dieser PAMPs führen entweder zum Tod oder aber zu einer drastischen Reduktion der adaptiven Fitness des Mikroorganismus (Medzhitov und Janeway, 2002; Nürnberger und Kemmerling, 2006).

Als allgemeine Elizitoren gelten z. B. Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien, Peptidoglykane Gram-positiver Bakterien, bakterielles Flagellin, der bakterielle Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), methylierte bakterielle DNA und Glukane, sowie Chitin von Pilzen (Medzhitov und Janeway, 2002; Nürnberger und Kemmerling, 2006; Gust et al., 2007; Zipfel, 2008). Analog zum tierischen System sind diese Stoffe in der Lage auch in Pflanzen eine Abwehrreaktion hervorzurufen (Kunze et al., 2004; Wan et al., 2008). Neben diesen mikrobiellen PAMPs können aber auch pflanzeneigene Stoffe Abwehrreaktionen auslösen. In diesem Fall handelt es sich um "Abbauprodukte" von pflanzlichen Strukturen, die immer nur dann entstehen, wenn ein Pathogen versucht eine Pflanze zu infizieren (Nürnberger et al., 2004).

Der zur Zeit wohl am besten charakterisierte pflanzliche Elizitor ist das bakterielle Flagellin. Flagellin ist eine Proteinuntereinheit des bakteriellen Flagellums und für die Fortbewegung und somit auch für die Virulenz vieler Bakterien von entscheidender Bedeutung (Ramos et al., 2004). Sowohl Tiere als auch Pflanzen haben Rezeptoren zur Erkennung von Flagellin entwickelt. Allerdings erkennen die Rezeptoren TLR5 (*TOLL-Like Receptor 5*) bei Tieren und FLS2 (*Flagellin-Sensing 2*) bei Pflanzen zwei völlig unterschiedliche Bereiche innerhalb desselben Moleküls. TLR5 bindet eine als D1 bezeichnete Domäne (Smith et al., 2003; Ramos et al., 2004), wohingegen FLS2 einen als "Spike" bezeichneten Bereich erkennt (Zipfel und Felix, 2005). Das von FLS2 erkannte Peptid ist 22 Aminosäuren lang und wird daher als Flg22 bezeichnet. Synthetisch hergestelltes Flg22 wirkt als wesentlich stärkerer Elizitor im Vergleich zu gereinigtem, natürlichen Flagellin (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez und Boller, 2002).

Ein weiterer gut untersuchter genereller Elizitor ist der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) (Kunze et al., 2004). Obwohl sich dieser Elongationsfaktor auch in pflanzlichen Mitochondrien und Chloroplasten finden lässt, weist nur das bakterielle Protein eine elizitierende Wirkung auf (Zipfel, 2008). Genau wie Flagellin besitzt auch dieses Protein alle Merkmale eines PAMPs: häufiges Auftreten, einen hohen Grad an Sequenzkonservierung über viele verschiedene Spezies hinweg und Unabdingbarkeit für das Überleben der Mikroben. Im Gegensatz zu Flagellin, das als Bestandteil des Flagellums an der Außenseite der Bakterien zu finden ist, befindet sich EF-Tu als Elongationsfaktor im Zellinneren des Bakteriums (Zipfel, 2008). Wie kommt es also dazu, dass Pflanzen dieses Protein perzipieren können? Aufgrund der sehr hohen Empfindlichkeit, mit der EF-Tu erkannt wird und der großen Menge an EF-Tu Protein in Bakterien wird vermutet, dass schon wenige abgestorbene und lysierte Bakterien ausreichen, um von der Pflanze erkannt zu werden (Zipfel, 2008). Darüber hinaus gibt es auch immer mehr Hinweise darauf, dass EF-Tu direkt auf der Bakterienoberfläche zu finden ist (Dallo et al., 2002; Granato et al., 2004; Kunert et al., 2007). Analog zu Flg22 konnte auch für EF-Tu ein Peptid identifiziert werden, welches die Immunantwort von Pflanzen auslöst. Dieses Peptid besteht aus den ersten 18 Aminosäuren des Proteins und wird als Elf18 bezeichnet (Kunze et al., 2004).

#### 1.1.1.2 Mustererkennende Rezeptoren

Für die Erkennung von PAMPs besitzen Pflanzen und Tiere eine Reihe von Rezeptoren. Hier zeigen sich erstaunliche molekulare Ähnlichkeiten zwischen den beiden unterschiedlichen Reichen. So weisen die für die Pathogenerkennung wichtigen TOLLund TOLL-ähnlichen-Rezeptoren (TLR) von *Drosophila melanogaster* bzw. von Säugetieren große Ähnlichkeiten in ihrem modularen Aufbau zu den pflanzlichen Rezeptorähnlichen-Kinasen (RLK) auf. In beiden Gruppen besitzen diese Rezeptoren eine Liganden-bindende extrazelluläre Domäne und beinhalten entweder selbst eine Kinase-Domäne (Pflanzen), oder aber rekrutieren andere Proteine mit Kinasefunktion (Tiere), um das aufgenommene Signal weiter zu leiten (Aderem und Ulevitch, 2000; Shiu und Bleecker, 2001; Nürnberger et al., 2004).

FLS2 ist eine Leucin-reiche Rezeptor-ähnliche Kinase (LRR-RLK) und der bislang am besten untersuchte PAMP-Rezeptor in Pflanzen. Er besteht aus einer extrazellulären Flagellin-bindenden Leucin-reichen Domäne, welche über eine Transmembrandomäne mit einer intrazellulären Kinase-Domäne verbunden ist (Gomez-Gomez et al., 2001). Erst vor kurzem konnten auch in Tabak und Tomate *At*FLS2-Orthologe identifiziert werden (Robatzek, 2007; Hann und Rathjen, 2007). Es stellte sich heraus, dass in Tomate ein kürzeres Epitop erkannt wird als in *Arabidopsis* (Robatzek, 2007). Dies zeigt, dass die PAMP-Erkennung zwar auf konservierten Strukturen aufbaut, diese aber dennoch einer evolutionären Variabilität und Flexibilität unterliegt.

Für die Aktivierung der Flagellin-induzierten Abwehrmaßnahmen ist jedoch nicht nur FLS2 allein verantwortlich. Nach Bindung von Flagellin an FLS2 kommt es zu einer Heterodimerisierung mit der Rezeptorkinase BAK1 (*Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1*; Chinchilla et al., 2007). Es konnte nachgewiesen werden, dass *bak1*-Mutanten anfälliger gegenüber nekrotrophen Pilzen sind (Kemmerling et al., 2007). Ursprünglich wurde BAK1 als Korezeptor für den Brassinosteroid-Rezeptor BRI1 (*Brassinosteroid Insensitive 1*) identifiziert (Li et al., 2002). Mutationen in der Brassinosteroid-Signaltransduktion führen unter anderem zu Zwergwuchs und verzögerter Seneszenz (Clouse, 1996; Clouse, 2002), aber nicht zu einer Veränderung in der Pathogenabwehr (Kemmerling et al., 2007).

Mittlerweile sind in Pflanzen weitere PAMP-erkennende Rezeptoren bekannt. 2006 wurde durch einen revers genetischen Versuch eine weitere LRR-RLK als Rezeptor für EF-Tu identifiziert (Zipfel et al., 2006). Kurz darauf wurde festgestellt, dass Chitin von CERK1/LysM-RLK1 gebunden wird (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008).

#### 1.1.1.3 Signaltransduktion nach PAMP-Erkennung

Ein weiterer wichtiger Schritt für eine erfolgreiche Abwehr von Pathogenen ist, neben der Erkennung einer Infektion, auch die Weiterleitung des Signals. Dabei werden die Signale, die von den unterschiedlichsten Pathogenen ausgelöst werden, nur über wenige und zum Teil gemeinsame Signalkaskaden weitergeleitet (Zipfel et al., 2006; Zhao und Qi, 2008).

Eine der wichtigsten Signalkaskaden ist die der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK). MAPK-Kaskaden sind konservierte Signalmodule, die in allen eukaryotischen Lebewesen identifiziert wurden (Colcombet und Hirt, 2008). Eine typische MAPK-Kaskade setzt sich aus drei Kinasen zusammen. Einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), einer MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) und einer MAP-Kinase (MAPK), wobei das Phosphorylierungssignal von der MAP3K über die MAP2K auf die MAPK über-tragen wird (Colcombet und Hirt, 2008). Am Ende dieser Signalkaskade steht oft die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die das Phosphorylierungssignal in die veränderte Expression von entsprechenden Genen umsetzen (Asai et al., 2002; Lee et al., 2004).

Für die Signaltransduktion nach Flagellin-Perzeption konnten zwei MAPK-Kaskaden identifiziert werden (Asai et al., 2002; Suarez-Rodriguez et al., 2007; Colcombet und Hirt, 2008). Behandelt man Arabidopsis-Pflanzen mit Flg22 kommt es schon nach fünf Minuten zu einer biochemischen Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3, MPK4 und MPK6 (Asai et al., 2002; Suarez-Rodriguez et al., 2007). MPK3 und MPK6 regulieren die Genexpression von FRK1 (Flg22-induzierte Rezeptorkinase 1) und WRKY29, einem Transkriptionsfaktor mit WRKY-DNA-Bindemotiv (Asai et al., 2002). Darüber hinaus phosphoryliert MPK6 unter anderem die ACC (1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxyl-Säure)-Synthase-6 (ACS6) (Liu und Zhang, 2004). ACS6 ist an der Biosynthese des für die Pathogenabwehr wichtigen Phytohormons Ethylen beteiligt (Ludwig et al., 2005) und wird durch diese Phosphorylierung stabilisiert (Joo et al., 2008). Für MPK3 konnte 2007 der Transkriptionsfaktor VIP1 (VirE1-Interacting Protein 1) als spezifisches Substrat identifiziert werden. Nach Flg22-Behandlung kommt es zur Phosphorylierung von VIP1 durch MPK3 und zu einer Relokalisierung von VIP1 aus dem Cytoplasma in den Zellkern. Dort induziert VIP1 die Expression von Pathogenabwehr-relevanten Genen (PR-Genen) (Djamei et al., 2007).

Für die Aktivierung dieser beschriebenen MAP-Kinase-Kaskade ist ein schneller Influx von Calcium in das Zellinnere notwendig (Jonak et al., 1999) und es kommt zusätzlich zu einer vermehrten Bildung von weiteren Signalmolekülen, wie z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie Stickstoffmonoxid (NO) und der, für die Pathogenabwehr relevanten Phytohormone Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Nürnberger et al., 2004; Chisholm et al., 2006; Ingle et al., 2006).

#### 1.1.2 Effektorproteine und wirtsspezifische Immunität

Trotz aller schon beschriebenen konstitutiv vorhandenen und induzierbaren pflanzlichen Abwehrmechanismen schaffen es Pathogene dennoch, diese Barrieren zu überwinden, Pflanzen zu infizieren und diese als Wirt zu nutzen. Im Rahmen der Koevolution zwischen Pathogen und Pflanze ist es aber möglich, dass durch den vom Pathogen auf die Pflanze ausgeübten Selektionsdruck neue Pflanzensorten innerhalb einer Art entstehen, die gegen ein bestimmtes Pathogen resistent sind (Jones und Dangl, 2006). In diesem Fall spricht man von der wirtsspezifischen Immunität. Diese Art der Resistenz kennzeichnet sich durch das Vorhandensein von so genannten Avirulenz-(Avr) und Resistenz-(R) Genen und die spezifische Interaktion der daraus resultierenden Genprodukte. Dieses Modell der Resistenz wurde bereits 1955 beschrieben und wird seitdem auch als Gen-für-Gen Hypothese bezeichnet (Flor, 1955). Ein charakteristisches Zeichen für eine Avr-Gen-R-Gen-Interaktion ist die sehr schnelle Ausbildung von nekrotischem Gewebe in unmittelbarer Umgebung zur Infektionsstelle. Dabei handelt es sich um eine beschleunigte und verstärkte Abwehrreaktion, die ähnlich der tierischen Apoptose, einen programmierten Zelltod darstellt, der bei Pflanzen als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird (Jones und Dangl, 2006; Greenberg und Yao, 2004).

Viele Avr-Gene, die in ihrer eigentlichen Funktion Virulenz-Gene darstellen, werden von Pathogenen exprimiert und sollen die Infektion eines Wirtes ermöglichen. Erst wenn eines dieser vom Virulenz-Gen kodierten Proteine mit einem von der Pflanze produziertem R-Gen-Produkt direkt oder indirekt interagiert (Guard-Hypothese), bezeichnet man das Gen als Avr-Gen, da es zur Resistenz der R-Gen tragenden Pflanze gegenüber dem Pathogen beiträgt (Dangl und Jones, 2001). Die eigentliche Funktion der Virulenz-Gen-Produkte kommt somit erst bei Pflanzen ohne entsprechendes R-Gen zum Tragen. Hier unterdrücken und hemmen sie aktiv die pflanzlichen Abwehrreaktionen und werden daher auch als Effektorproteine bezeichnet (Abramovitch et al., 2003; Jones und Dangl, 2006).

Zum Einschleusen ihrer Effektoren in die Pflanzenzelle besitzen Gram-negative Bakterien das so genannte Typ-III-Sekretionssystem (Tang et al., 2006). Es besteht aus mehreren Membranringen, die eine nadelartige Struktur bilden (Tang et al., 2006). Mit Hilfe dieser "Nadel" injizieren diese Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Effektorproteine in das Zellinnere und unterdrücken so pflanzliche Abwehrreaktionen (Tang et al., 2006; Grant et al., 2006; Block et al., 2008). Ein sehr gut untersuchtes Effektorprotein ist z. B. AvrPto aus *Pseudomonas syringae*. Dieses Protein interagiert nach dem Transfer in das Zellinnere mit dem Flagellin-Rezeptor FLS2 bzw. dem Ko-Rezeptor BAK1 und blockiert so die Flagellin-induzierte Signaltransduktion (Shan et al., 2008; Xiang et al., 2008). Einige andere Effektorproteine besitzen eine E3-Ligasefunktion (Rosebrock et al., 2007). Diese Proteine bewirken eine Ubiquitinylierung ihrer Zielproteine, die zum Abbau dieser Proteine im 26S-Proteasom führt (Zeng et al., 2006). Für viele andere Effektorproteine konnte jedoch bislang weder eine Funktion gezeigt, noch vorhergesagt werden.

Wie bei der PAMP-vermittelten Pathogenabwehr wurde auch bei der R-Gen-vermittelten HR die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid beschrieben (Heath, 2000a). Des Weiteren ist auch bei dieser Abwehrreaktion das Phytohormon Salicylsäure (SA) von besonderer Bedeutung, da Salicylsäure-defiziente Pflanzen keine HR aufweisen (Heath, 2000a). Darüber hinaus ist SA auch für die Ausbildung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) von entscheidender Bedeutung (Loake und Grant, 2007). Bei der SAR handelt es sich um eine Reaktion der Pflanze auf ein Pathogen, welches Nekrosen verursacht, wobei es nicht darauf ankommt ob diese durch eine Gen-für-Gen Interaktion hervorgerufen werden, oder ob es sich bei ihnen um Krankheitssymptome handelt (Durrant und Dong, 2004). Pflanzen die eine SAR entwickeln sind für einen längeren Zeitraum resistenter gegenüber viralen, bakteriellen und pilzlichen Phytopathogenen (Mishina und Zeier, 2007). Als ein weiteres, für die HR wichtiges Signalmolekül, konnte Calcium identifiziert werden (Grant et al., 2000). Bislang ist aber nicht geklärt, wie Pflanzen bei der Nutzung gleicher Signalmoleküle, zwischen wirtsspezifischer und nichtwirtsspezifischer Immunität unterscheiden.

#### 1.1.3 Calcium als Signalmolekül

Eine der ersten pflanzlichen Reaktionen nach der Erkennung von Pathogenen oder PAMPs ist der Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration (Hetherington und Brownlee, 2004; Lecourieux et al., 2006). Calcium fungiert sowohl bei Pflanzen, als auch bei Tieren, als wichtiger sekundärer Botenstoff und reguliert bei Pflanzen neben der Pathogenabwehr (Blume et al., 2000; Lecourieux et al., 2006) auch entwicklungsbiologische Prozesse (Knight et al., 1995; Reddy, 2001; Chen et al., 2008), Anpassungen an abiotische Stresssituationen (Song et al., 2008) und die Ausbildung von symbiotischen Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen (Navazio et al., 2007; Peiter et al., 2007; Oldroyd und Downie, 2008).

Da Calcium bei all diesen sehr verschiedenen Stimuli als sekundärer Botenstoff fungiert, war lange Zeit unklar, wie dieses unspezifische Signal in eine spezifische Antwort der Pflanze übersetzt wird. Heute weiß man, dass unterschiedliche Reize verschiedene Calciummuster innerhalb der Zelle hervorrufen (McAinsh und Pittman, 2009). Diese Muster setzten sich zum einen aus der Stärke der Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration, der Dauer des Signals, sowie der Frequenz, mit der die Calciumkonzentration innerhalb der Zelle oszilliert, zusammen. Die Art des Calciummusters ist aber auch davon abhängig, welches Organ, Gewebe oder welcher Zelltyp dem Stress ausgesetzt ist (Lecourieux et al., 2006; McAinsh und Pittman, 2009).

Bei der Pathogenabwehr von Pflanzen konnte gezeigt werden, dass der Einstrom von extrazellulärem Calcium in das Zellinnere wichtig für die Bildung von Phytoalexinen ist (Mithofer et al., 1999; Blume et al., 2000). Wird der Einstrom von Calcium durch die Zugabe von Chelatoren wie EGTA unterbunden, so ist auch keine Transkriptakkumulation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) mehr zu beobachten (Lecourieux et al., 2002). PAL katalysiert den ersten Schritt der Phenylpropanoidsynthese und ist somit essentiell für die Bildung von Phytoalexinen (Wanner et al., 1995).

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Bakterien extrazelluläre Polysaccharide produzieren, die in der Lage sind das apoplastisch gelagerte Calcium zu chelatieren und somit den Einstrom von Calcium aus dem Apoplasten in das Zellinnere verhindern (Aslam et al., 2008). All diese Daten verdeutlichen die Bedeutung von Calcium als Signalmolekül bei der Abwehr von Pathogenen.

Für die Perzeption der intrazellulären Calciumkonzentrationen besitzen Pflanzen unterschiedliche Klassen von Calcium-bindenden Proteinen (Harper et al., 2004; Harper und Harmon, 2005). Es handelt sich dabei um Calmodulin, dass nach der Bindung mit Calcium mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen interagiert, und diese somit in ihrer Aktivität reguliert. Bei diesen Calmodulin-abhängig regulierten Proteinen kann es sich unter anderem um Kinasen (Banba et al., 2008; Yano et al., 2008) oder Transkriptionsfaktoren handeln (Galon et al., 2008; Doherty et al., 2009; Du et al., 2009). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der CaM-abhängige Transkriptionsfaktor *At*SR1/CAMTA3 ein negativer Regulator der biotischen Stressantwort ist und die Bildung von Salicylsäure hemmt (Galon et al., 2008; Du et al., 2009). Zwei weitere wichtige Calcium-regulierte Proteinklassen sind Calcineurin B-ähnliche (CBL) Proteine, die CBL-interagierende Protein-Kinasen (CIPK) regulieren (Luan, 2009), und Calciumabhängige Protein-Kinasen (CDPK).

#### 1.1.4 Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs)

Obwohl Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs) seit mehr als 25 Jahren bekannt sind (Hetherington und Trewavas, 1982), weiß man nur sehr wenig über deren Funktion und Regulation. CDPKs sind Serin/Threonin-Protein-Kinasen, die nur in Pflanzen und einigen Protisten, wie dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* zu finden sind (Harper und Harmon, 2005; Nagamune et al., 2008). In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* konnten aufgrund von Sequenzhomologien 34 Isoformen identifiziert werden (Cheng et al., 2002). Die Anzahl der CDPK-Isoformen variiert allerdings abhängig von der Pflanzenspezies. So sind in den monokotyledonen Pflanzen Reis (*Oryza sativa*) und Weizen (*Triticum aestivum*) bislang 31 bzw. 20 Isoformen identifiziert worden (Ray et al., 2007; Li et al., 2008).

Die CDPKs aus *Arabidopsis* können aufgrund ihrer Sequenzidentität in 4 Unterfamilien eingeteilt werden (Abb. 1.1). Die in dieser Arbeit untersuchten *At*CPK5 und *At*CPK6 besitzen 87% identische Aminosäuren. Ob diese hohe Sequenzhomologie auch ähnliche biologische Funktionen bedeutet, ist bisher noch nicht bekannt. Es gibt Daten, die einen solchen Schluss nahelegen. So sind die nah verwandten *At*CPK4 und *At*CPK11 beide an der Abscisinsäure-abhängigen Signaltransduktion beteiligt (Zhu et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass die weit entfernt verwandten Proteine *At*CPK3 und *At*CPK6 wichtig für die Regulation der Schließzellenappertur sind (Mori et al., 2006).



Abbildung 1.1 Verwandtschaftsverhältnisse von CDPKs aus *Arabidopsis thaliana*: Analyse der vollständigen Proteinsequenz aller bekannten CPKs aus *Arabidopsis thaliana*. Die Länge der Äste zeigt an, wie nah bzw. weit die einzelnen Proteine miteinander verwandt sind. Die Markierung 0,1 entspricht 10 % Unterschied. Die in dieser Arbeit untersuchten *At*CPK5 und *At*CPK6 sind rot markiert. Abbildung modifiziert nach Cheng et al. 2000.

#### 1.1.4.1 Struktureller Aufbau von CDPKs

CDPKs besitzen einen hoch konservierten und charakteristischen modularen Proteinaufbau mit vier Domänen (Abb. 1.2). Sie bestehen aus einem variablen N-Terminus (V), einer Protein-Kinase-Domäne (K), einer Verbindungs-Domäne (*Junction-Domain*) (J), und der C-terminal gelegenen Calmodulin-ähnlichen Domäne (CLD).

Die N-terminale Variable-Domäne weist die größten Unterschiede in Länge und Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen CDPKs auf und wird daher für die Substrat-



Abbildung 1.2 Allgemeine Domänenstruktur von CDPKs: Calcium-abhängige Protein-Kinasen bestehen aus einer N-terminalen Variablen-Domäne (V), einer Protein-Kinase Domäne (K), einer autoinhibitorischen Verbindungs-Domäne (*Junction-Domain*, J) und einer Cterminalen Calmodulin-ähnlichen Domäne (CLD) mit normalerweise 4 Calcium-bindenden EF-Händen. Nach Freymark et al. 2007.

spezifität der einzelnen Isoformen verantwortlich gemacht (Cheng et al., 2002). Darüber hinaus besitzen 29 der 34 CDPK Isoformen aus *Arabidopsis* am N-Terminus eine potentielle Myristoylierungssequenz (Freymark et al., 2007). Diese posttranslationale Modifikation ermöglicht eine Anheftung des Proteins an Zellmembranen.

Die Protein-Kinase-Domäne der CDPKs zeigt die größte Sequenzhomologie innerhalb aller Isoformen. Sie enthält das aktive Zentrum für die Protein-Kinase-Aktivität, sowie die ATP-Bindestelle (Cheng et al., 2002).

C-terminal von der Protein-Kinase-Domäne liegt die Verbindungs-Domäne. Sie ist ca. 31 Aminosäuren lang und verbindet die Protein-Kinase-Domäne mit der Calmodulinähnlichen Domäne. Darüber hinaus fungiert sie als autoinhibitorisches Pseudosubstrat für die Protein-Kinase-Domäne (Cheng et al., 2002).

Die C-terminal gelegene Calmodulin-ähnliche Domäne weist eine ca. 40% ige Sequenzidentität zu Calmodulin auf und fungiert als Calciumsensor. Normalerweise findet man in dieser Domäne vier calciumbindende EF-Hand-Motive (Chandran et al., 2006). Es gibt aber auch Isoformen, die nur noch eine (*At*CPK25), zwei (*At*CPK13) oder drei (*At*CPK7, 8, 10, 14, 19, 22) vollständige EF-Hand-Motive aufweisen (Cheng et al., 2002).

#### 1.1.4.2 Biochemische Aktivierung von CDPKs

Aufgrund von biochemischen *in vitro*-Daten (Harmon et al., 1994; Harper et al., 1994; Huang et al., 1996; Yoo und Harmon, 1996; Vitart et al., 2000; Weljie et al., 2003) konnte folgendes Modell für die biochemische Aktivierung von CDPKs entwickelt werden: Im Ruhezustand bindet der autoinhibitorische Bereich der Verbindungs-Domäne am aktiven Zentrum der Kinase-Domäne und blockiert so den Zugang von Substraten. Nach stressinduzierter Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration kommt es zur Bindung von Calcium an die EF-Hand-Motive und damit zu einer Konformationsänderung des Proteins. Dies führt dazu, dass die autoinhibitorische Verbindungs-Domäne aus dem aktiven Zentrum der Kinase-Domäne entfernt wird und so den Zugang von Substraten



A) Vollständiges Protein

Abbildung 1.3 Aktivierungsmodell für CDPKs: A) Im Ruhezustand blockiert die autoinhibitorische Verbindungs-Domäne den Zugang von Substraten ins aktive Zentrum der Kinase-Domäne. Nach Stressstimulus kommt es zu einem Einfluss von Calcium ins Zellinnere. Die EF-Hände binden das Calcium und die dadurch entstehende Konformationsänderung zieht die Verbindungs-Domäne aus dem aktiven Zentrum. Es kommt zur Phosphorylierung der Substrate und zur Autophosphorylierung der CDPK selbst. B) Die konstitutiv aktive Form der CDPKs besteht nur aus der N-terminalen Variablen-Domäne (V) und der Kinase-Domäne (K). Durch das Fehlen der autoinhibitorischen Verbindungs-Domäne und der Calmodulinähnlichen Domäne ist die Kinase Calcium-unabhängig aktiv. Nach Freymark et al. 2007.

ermöglicht. Im weiteren Verlauf kommt es bei nahezu allen CDPKs zu Autophosphorylierungen, die neben dem Calciumstimulus, für die Regulation der CDPKs verantwortlich gemacht werden (Abb. 1.3 A) (Harper et al., 2004).

Entfernt man die CLD und Verbindungs-Domäne vom restlichen Protein, so erhält man eine Calcium-unabhängige Kinase, die nur noch aus der Variablen- und der Kinase-Domäne (VK) besteht und als konstitutiv aktive Form bezeichnet wird (Abb. 1.3 B) (Ludwig et al., 2005).

Abweichend von diesem Modell wurde für zwei CDPKs aus der Goabohne (Psopho-

*carpus tetragonolobus*) gezeigt, dass *Pt*CDPK eine Calcium-unabhängige Autophosphorylierung (Saha und Singh, 1995) und *Pt*PK gar keine Autophosphorylierungsaktivität aufweist (Ganguly und Singh, 1998). Dass Autophosphorylierungen jedoch für die Regulation der Aktivität von Bedeutung sind, zeigen zwei Beispiele. Für *Nt*CDPK2 konnte eine *in vivo*-Aktivierung des Enzyms durch die Autophosphorylierung nachgewiesen werden (Romeis et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei *Pt*CDPK eine Inhibition der Aktivität durch Autophosphorylierung (Saha und Singh, 1995).

Hegeman et al. veröffentlichten 2006 *in vitro*-Autophosphorylierungsstellen von sieben rekombinanten CDPKs aus *Arabidopsis thaliana*. Dabei identifizierten sie konservierte Phosphorylierungstellen in der Variablen-, Kinase- und Calmodulin-ähnlichen Domäne (Hegeman et al., 2006). Es bleibt jedoch offen, in wieweit sich diese *in vitro*-Daten auf *in vivo*-Situationen übertragen lassen. Weiterhin ist unklar, in welchem Zusammenhang Autophosphorylierung und Calciumbindung bei der Regulation der CDPKs stehen.

Neben der Regulation durch Autophosphorylierung konnte zumindest für *Nt*CDPK2 gezeigt werden, dass dieses Protein auch durch Phosphorylierungen anderer Kinasen reguliert wird (Romeis et al., 2001; Witte und Romeis, unveröffentlichte Daten).

#### 1.1.4.3 Biologische Funktion von CDPKs

Aufgrund der großen Anzahl an identifizierten CDPK-Isoformen geht man davon aus, dass sie, zusammen mit dem CBL-CIPK-Netzwerk, die wichtigsten "Übersetzer" der Calcium-vermittelten Signaltransduktion in Pflanzen sind (Cheng et al., 2002; Harper und Harmon, 2005). Es überrascht daher auch nicht, dass CDPKs als Signaltransduktionskomponenten bei sehr unterschiedlichen biologischen Funktionen identifiziert wurden. Sie werden mit der Regulation des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus (McMichael et al., 1995; Zhang und Chollet, 1997; Ogawa et al., 1998), der Ethylenbiosynthese (Sebastia et al., 2004), des Ionentransports (Berkowitz et al., 2000; Mori et al., 2006) und der Cytoskelettorganisation (Allwood et al., 2001) in Verbindung gebracht.

Darüber hinaus konnte zum Beispiel für *OsCDPK7* aus *Oryza sativa* gezeigt werden, dass die Transkription dieses Gens nach Kälte- und Salzstress induziert wird (Saijo et al., 2000). Transgene Pflanzen, die *OsCDPK7* überexprimieren, besitzen eine erhöhte Toleranz gegenüber diesen beiden Stressfaktoren (Saijo et al., 2000). Auch für *OsCDPK13* konnte eine Induktion der Genexpression nach Kältestress nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *OsCDPK7* wird *OsCDPK13* allerdings nach Salz- und Trockenstress transkriptionell inhibiert (Abbasi et al., 2004).

Für CDPK1 aus Tabak konnte gezeigt werden, dass sie den Transkriptionsfaktor RSG

(*Repression of shoot growth*) Gibberellin-abhängig phosphoryliert (Ishida et al., 2008). Diese Phosphorylierung ermöglicht eine Interaktion von RSG mit 14-3-3-Proteinen und verhindert so den Transport von RSG in den Zellkern (Ishida et al., 2004).

Auch CDPKs aus *Arabidopsis thaliana* reagieren auf abiotische Stressfaktoren. So werden *AtCPK10* und *AtCPK11* nach Salz- und Trockenstress transkriptionell aktiviert (Urao et al., 1994). 2007 konnten Zhu et al. nachweisen, dass *At*CPK4 und *At*CPK11 nach Abscisinsäure-Applikation akkumulieren und biochemisch aktiviert werden. Des Weiteren ist die ABA- und Calcium-abhängige Regulation der Stomata von *Arabidopsis* in *cpk3*- und *cpk6*-Doppelmutanten beeinträchtigt (Mori et al., 2006). Darüber hinaus führt sowohl der KO von *AtCPK21* (Franz, 2008; Franz und Romeis, unveröffentlicht) als auch von *AtCPK23* (Ma und Wu, 2007) zu einer erhöhter Toleranz gegenüber Salz-und Trockenstress.

#### 1.1.4.4 CDPKs und Pathogenabwehr

So eindeutig die Hinweise auf eine wichtige Rolle von Calcium als Signal während der Pathogenabwehr sind, so wenig weiß man in diesem Zusammenhang über die Signaltransduktion der Calcium-abhängigen Proteine, insbesondere der CDPKs.

Die bedeutendsten Hinweise auf eine Beteiligung von CDPKs an der Pathogenabwehr stammen aus Untersuchungen an Tabak und Gerste (Romeis et al., 2000; Romeis et al., 2001; Ludwig et al., 2005; Freymark et al., 2007). So konnte für NtCDPK2 gezeigt werden, dass dieses Protein in der Cf-9/Avr9-abhängigen Gen-für-Gen Interaktion biochemisch aktiviert wird (Romeis et al., 2001). Nach VIGS (Virus Induced Gene Silencing)-vermittelter Hemmung der Translation der NtCDPK2-Unterfamilie konnte eine Reduktion der Cf-9/Avr9-abhängigen hypersensitiven Antwort beobachtet werden (Romeis et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigte sich in gain-of-function-Experimenten mit einer NtCDPK2-VK Variante, dass Pflanzen, die dieses Protein exprimierten, eine erhöhte Menge an ROS, eine stärkere Phytohormonsynthese, eine erhöhte Expression von Pathogenabwehr-relevanten Genen und vermehrt HR-ähnliche Symptome aufwiesen, obwohl keine Elizitierung erfolgte (Ludwig et al., 2005). Die Mutation der Myristoylierungssequenz in NtCDPK2-VK führt darüber hinaus, im Vergleich zum korrekt lokalisierten Protein, zu einer verringerten Zelltodinduktion nach transienter Expression in N. benthamiana (Witte und Romeis, unveröffentlichte Daten). Dies verdeutlicht, dass nicht nur die Proteinaktivität allein, sondern auch die richtige Lokalisierung innerhalb der Zelle für die korrekte intrazelluläre Weiterleitung des Signals wichtig ist.

In Gerste konnten zwei CDPK-Isoformen isoliert werden (HvCDPK3 und HvCDPK4),

die eine Transkriptakkumulation nach Infektion mit dem Mehltau-Erreger *Blumeria graminis* aufwiesen (Zierold et al., 2005). Nähere Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese beiden Proteine wohl eine gegenteilige Funktion besitzen (Freymark et al., 2007). Während die Überexpression der konstitutiv aktiven *Hv*CDPK3-VK zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *B. graminis* f. sp. *hordei* führte, war dies für *Hv*CDPK4-VK nur dann zu beobachten, wenn die Aktivität dieser Kinase durch die Expression der *Hv*CDPK4-Verbindungs-Domäne inhibiert wurde.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zwei CDPK-Isoformen aus Kartoffel (*St*CDPK4 und *St*CDPK5) in der Lage sind, die NADPH-Oxidase *St*RbohB zu phosphorylieren (Kobayashi et al., 2007). Die transiente Expression von verkürzten, konstitutiv aktiven Formen von *St*CDPK4 und *St*CDPK5 in *N. benthamiana* führte darüber hinaus zu einer RbohB abhängigen ROS-Bildung (Kobayashi et al., 2007).

Für CDPKs aus *Arabidopsis thaliana* ist jedoch bisher unbekannt, ob sie z. B. bei R-Gen-vermittelten Abwehrreaktionen oder der Regulation der Basal-Abwehr eine Rolle spielen.

## 1.2 Ziel der Arbeit

Calcium reguliert in Pflanzen als sekundärer Botenstoff viele sehr unterschiedliche zelluläre Prozesse, unter anderem auch Abwehrreaktionen nach Pathogenbefall. Calciumabhängige Protein-Kinasen (CDPK), die nur in Pflanzen und einigen Protisten zu finden sind, werden als wichtige Komponenten bei der Übersetzung dieser Calciumsignale diskutiert.

Vorarbeiten im Labor der AG Romeis zeigen, dass zwei CDPKs aus *Arabidopsis thaliana* (*At*CPK5 und *At*CPK6) in ihrer verkürzten konstitutiv aktiven Form Zelltodähnliche Symptome nach transienter Expression in *N. benthamiana* verursachen. Dieser Effekt ist bereits von der, an der Wirts-spezifischen Immunantwort beteiligten, CDPK2 aus *Nicotiana tabacum* bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der reversen Genetik, Überexpressionslinien und biochemischen Methoden eine Funktion von *At*CPK5 und *At*CPK6 während der frühen Pathogenantwort in *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von AppliChem (Darmstadt), General Electrics Healthcare (München), Biorad (München), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Duchefa Biochemie (Haarlem, NL) oder Sigma (Steinheim) bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien stammen von Difco Lab. (Detroit, USA) und Duchefa Biochemie (Haarlem, NL). Nukleinsäure-modifizierende Enzyme wurden von Bioline (Luckenwalde), Roboklon (Berlin), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Promega (Mannheim) und Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) verwendet. Blottingmembranen wurden von General Electrics Healthcare bezogen. StrepTactin für die Affinitätschromotographie wurde von der Firma IBA (Göttingen). Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) geliefert. Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen. Autoradiographien wurden mittels des PhosphoImagers FLA-2000G der Firma FujiFilm (Düsselforf) detektiert.

### 2.1.2 Nährmedien

Zu Selektionszwecken wurde den Medien, die in Tabelle 2.1 beschrieben sind, nach Abkühlen auf ca. 55°C das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die jeweiligen Konzentrationen können aus Tabelle 2.2 entnommen werden. Für MS-Agar wurden 8 g/l Plant Agar (Duchefa) verwendet.

| Medium   | Inhaltsstoffe  |
|----------|--|
| LB       | 1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,0 % (w/v) NaCl mit 1M NaOH auf pH 7,0 einstellen, in $H_2O$   |
| YEB      | 0,5 % (w/v) Fleisch-Extrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Hefe Extrakt; 2 mM 1M MgSO <sub>4</sub> , mit 1M NaOH auf pH 7,2 einstellen in $H_2O$ |
| CR       | 2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) MgSO <sub>4</sub> , 10 mM KCl  |
| King's B | 20 g/l Glyzerol; 40 g/l Proteose-Peptone; nach dem Autoklavieren:<br>1,5 g/l K <sub>2</sub> HPO4 und 1,5 g/l MgSO <sub>4</sub> steril filtriert hinzugeben                 |
| 1/2 X MS | 2,2 g/l MS-Salz (Duchefa); pH 5,7 mit KOH einstellen   |

Tabelle 2.1 Verwendete Nährmedien

Tabelle 2.2 Verwendete Antibiotika und deren Arbeitskonzentrationen

| Abtibiotikum  | Endkonzentration                                  |
|---------------|---|
| Ampicilin     | 50 μg/μl  |
| Carbenicilin  | $50 \ \mu g/\mu l$                                |
| Gentamycin    | $15 \ \mu g/\mu l$                                |
| Kanamycin     | $50 \ \mu g/\mu l$                                |
| Rifampicin    | 50 $\mu$ g/ $\mu$ l (aus 25 mg/ml in Methanol)    |
| Spectinomycin | 100 oder 200 μg/μ1                                |
| Tetracyclin   | 12,5 $\mu$ g/ $\mu$ l (aus 12,5 mg/ml in Ethanol) |

## 2.1.3 Verwendete Bakterien- und Pilzstämme

In der Tabelle 2.3 sind die verwendeten Bakterienstämmen mit ihren Genotypen aufgelistet.

| Spezies                               | Stamm               | Genotyp   |  |  |
|---------------------------------------|---------------------|---|--|--|
| Escherichia coli                      | DH10B               | $F^-$ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG<br>rpsL ΔlacX74 $\phi$ 80lacZΔM15 araD139<br>Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-<br>mcrBC) $\lambda^-$   |  |  |
|                                       | Mach1               | $\Delta recA1398$ endA1 tonA $\phi 80\Delta lacM15 \Delta lacX74$   |  |  |
|                                       | (Invitrogen)        | $hsdR(r_K - m_K^+)$   |  |  |
| -                                     | TOP10               | F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)  |  |  |
|                                       | One Shot            | $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>r</sup> ) endA1 $\lambda$ <sup>-</sup>                                   |  |  |
|                                       | DB3.1 <sup>TM</sup> | $F^{-}$ gyrA462 endA1 glnV44 Δ-(sr1-recA) mcrB<br>mrr hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ara14 galK2 lacY1 proA2<br>rpsL20(Sm <sup>r</sup> ) xyl5 Δleu mtl1 |  |  |
| Pseudomonas<br>syringae pv.<br>tomato | DC3000              | Rif <sup>r</sup> , Cor <sup>r</sup>   |  |  |
|                                       | avrRpm1             | pVSP61-avrRpm1, Rif <sup>r</sup> , te <sup>r</sup> (Bisgrove et al., 1994)  |  |  |
|                                       | hrcC <sup>-</sup>   | Rif <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> (nptII) (S. Nimchuk)  |  |  |
| Agrobacterium                         | GV3103:             | T-DNA <sup>-</sup> , Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>  |  |  |
| tumefaciens                           | pMP90RK             | (Koncz und Shell, 1986)   |  |  |
|                                       | C58C1:pCH32         | C58C1, Ri <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> (Voinnet et al., 2003)   |  |  |

Weiterhin wurde der nekrotrophe Pilz *Alternaria brassicicola* (Mu CL 20297) verwendet.

#### 2.1.4 Verwendetes Pflanzenmaterial

Als Wildtyp (WT) Kontrolle dienten in allen Versuchen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotypes Columbia 0 (Col-0). Die T-DNA-Insertions-*Knock-out* (KO) Linien wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC, http://nasc.nott.ac.uk) bezogen. Alle KO-Linien wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (s. Kap. 2.5.6) auf die entsprechenden T-DNA-Insertionen überprüft. Die homozygoten KO-Pflanzen jeder Linie wurden dann in der T3-Generation bereitgestellt. In Tabelle 2.5 sind alle verwendeten Pflanzen-Linien aufgeführt.

| Ökotyp     | Abkürzung | Originalquelle  |
|------------|-----------|---|
| Columbia-0 | Col-0     | J. Dangl, University of North Carolina, Chapel<br>Hill, NC, USA |

#### **Tabelle 2.4 Verwendeter Wildtyp**

#### Tabelle 2.5 Verwendete Knock-out-Linien

| Name   | Knock out-Linie | AGI-Nummer |
|--------|-----------------|------------|
| сркб   | SALK_025460     | At2g17290  |
| bak1-3 | SALK_034523     | At4g33430  |
| fls2   | SALK_093905     | At5g46330  |

### 2.2 Pflanzenanzucht

Alle Pflanzen wurden entweder unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) oder Kurztagbedingungen (8 h Licht / 16 h Dunkelheit) bei ca. 21°C und einer Lichtmenge von 150  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s kultiviert. Die Aussaat erfolgte entweder auf Erde (1:1:2 Mischung aus T-Erde:P-Erde (Gebr. Patzer):Perligran) oder unter sterilen Bedingungen auf 1/2 MS-Agar Platten. In allen Fällen wurden die Samen zur Stratifikation für 2 Tage bei 4°C im Dunkeln inkubiert und danach den entsprechenden Lichtbedingungen ausgesetzt.

## 2.3 Anzucht von Escherichia coli, Pseudomonas syringae pv. tomato und Agrobacterium tumefaciens

Wenn keine anderen Angaben gemacht werden, wurden alle *E. coli* Stämme entweder auf LB-Agar bei 37°C über Nacht oder in LB-Medium bei 37°C und ca. 180 upm über Nacht kultiviert. Zur Selektion wurden den Medien, entsprechend dem Bakterienstamm und transformiertem Plasmid, Antibiotika zugesetzt (Tabelle: 2.2)

Alle *Pseudomonas* Stämme wurden im Allgemeinen auf King's B-Agar (für längere Lagerung bei 4°C) oder aber LB-Agar (Bakterienwachstumsversuche) etwa 48 h bei 28°C inkubiert. Die Anzucht in Flüssigmedium erfolgte immer in King's B-Medium bei 28°C und ca. 200 upm. Den Medien wurden, je nach Stamm, die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

Agrobacterium tumefaciens wurde auf LB-Plattten mit Rifampicin (50  $\mu$ g/ml), Gentamycin (25  $\mu$ g/ml), Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) und dem Vektor entsprechendem Antibiotika bei 28°C für etwa 48 h inkubiert.

## 2.4 Transformationen

#### 2.4.1 Herstellung chemo-kompetenter Escherichia coli

Zur Herstellung chemo-kompetenter E. coli wurden 5 ml einer Übernachtkultur auf 200 ml CR-Medium (2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) MgSO<sub>4</sub> 0,074 % (w/v) KCl (10 mM), in H<sub>2</sub>O) überimpft und in einem Erlenmeyer-Kolben bei 37°C und 200 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 2.000 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 MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin, mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,8; sterilfiltriert, in H<sub>2</sub>O) vorsichtig resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 8 ml Transformations-Puffer II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin, mit 1 M NaOH auf pH 6,5; sterilfiltriert, in H<sub>2</sub>O) aufgenommen und in Reaktionsgefäßen zu je 200  $\mu$ l aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.4.2 Herstellung elektro-kompetenter Agrobacterium tumefaciens

Zwei 5 ml Übernachtkuturen in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden auf 200 ml LB ohne Antibiotikum überimpft. Die Kulturen wurden bei 28°C und 180 upm inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> 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 H<sub>2</sub>O (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  $\mu$ l wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.
#### 2.4.3 Transformation von Plasmid-DNA in Escherichia coli

Ein Aliquot (100 $\mu$ 1) von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen des Stammes DH10B (bzw. TOP10 oder Mach1) wurde mit 2-4  $\mu$ 1 DNA-Lösung versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein 90 s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Nach der Zugabe von 450  $\mu$ 1 LB-Medium und einer 45 min. Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden 50  $\mu$ 1 bzw. 450  $\mu$ 1 des Ansatzes auf LB-Agar Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.4.4 Transformation von Plasmid-DNA in Agrobacterium tumefaciens

Zur Transformation von Agrobakterien wurden 40  $\mu$ l, auf Eis aufgetaute, elektrokompetente Zellen mit 2  $\mu$ l Plasmid-DNA (100-250 ng/ $\mu$ l) 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 upm im Eppendorf-Schüttler inkubiert. 50  $\mu$ l wurden auf YEB-Agar mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2-4 Tage bei 28 °C inkubiert.

## 2.4.5 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* Col-0 mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die benötigten binären Vektoren (siehe Tabelle 2.5.1) wurden mit dem Gateway-System<sup>TM</sup> von Invitrogen (s. Kap. 2.5.6.2) hergestellt und in *E. coli* transformiert (s. Kap. 2.4.3). Nach Plasmid-Minipräparation (s. Kap. 2.5.3) und Verifizierung der Konstrukte (Restriktionsanalyse (s. Kap. 2.5.9) und Sequenzierung (s. Kap. 2.5.11) wurden Agrobakterien des Stammes GV3101::pMP90RK mit den Konstrukten transformiert (s. Kap. 2.4.4). Der Erfolg der Agrobakterien Transformation wurde mittels Agrobakterien Plasmid-Minipräparation (s. Kap. 2.5.4), Retransformation der Konstrukte in *E. coli* und anschließender Restriktionsanalyse überprüft.

Mit den so transformierten Agrobakterien wurde aus einer 5 ml LB-Übernachtkultur (+ Antibiotika, siehe Tabelle: 2.2) eine 500 ml LB-Kultur (+Antibiotika) angeimpft und 16-24h bei 28°C und 120 upm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, mit 5 %iger Saccharose-Lösung auf eine  $OD_{600}=0,8$  eingestellt und 0,02 % Silwet hinzugefügt. *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen, die erst seit kurzem in Blüte standen, wurden für einige Sekunden in die Bakterienlösung getaucht und für 24h mit einer Plastiktüte abgedeckt. Danach reiften die Pflanzen normal ab. Zur Selektion der Transformanten wurde in Abhängigkeit

von dem verwendeten Vektor Glufosinat (BASTA, Bayer) verwendet.

# 2.5 DNA-Analytik

## 2.5.1 Verwendete Plasmide

In der Tabelle 2.6 sind alle verwendeten Plasmide und ihre wichtigsten Eigenschaften aufgelistet. Die Tabellen 2.7 und 2.8 fassen alle in dieser Arbeit generierten Plasmide zusammen

| Vektor  | Charakteristika  | Verwendung   |
|---|--|--|
| pCR <sup>®</sup> -BluntII-<br>TOPO <sup>®</sup><br>(Invitrogen) | ori pUC, M13 forward und<br>reverse Primer Bindestellen,<br>SP6 und T7 Promoter, Kan <sup>r</sup> ,<br><i>ccdb</i> -ORF                  | TOPO <sup>®</sup> -Vektor zum Klonieren<br>von Blunt-End PCR-Produkten   |
| pENTR <sup>TM</sup> /D-<br>TOPO <sup>®</sup><br>(Invitrogen)    | ori pUC, M13 forward und<br>reverse Primer Bindestellen,<br>T7 Promoter, <i>rrnB</i> T1 und T2<br><i>attL1, attL2</i> , Kan <sup>r</sup> | TOPO <sup>®</sup> -Vektor zum gerichteten<br>Klonieren von PCR-Produkten   |
| pJET1.2/blunt<br>(Fermentas)                                    | rep(pMB1), Amp <sup>r</sup> , eco47IR,<br>P <sub>lacUV5</sub> , T7 Promoter,<br>pJET1.2 forward und revers<br>Primer Bindersteller       | Blunt-End Vektor zum Klonie-<br>ren von PCR-Produkten  |
| pXCS-<br>HA/StrepII   | ori ColE1, ori RK2, P35S,<br>pA35S, BASTA <sup>r</sup> Hämagglu-<br>tinin (HA), StrepII  | binärer Vektor für carboxy-<br>terminale HA-Strep-Fusion und<br>Überexpression in <i>planta</i>                                      |
| pXCSG-StrepII<br>(Witte et al.,<br>2004)                        | ori ColE1, ori RK2, P35S, pA35S, BASTA <sup>r</sup> StrepII  | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer<br>Vektor für carboxy-terminale<br>StrepII-Fusion und Überexpres-<br>sion in <i>planta</i> |

| Tabelle 2.6 | Verwendete | Vektoren |
|-------------|------------|----------|
|-------------|------------|----------|

| pXCSG-3Myc                            | ori ColE1, ori RK2, P35S,                                | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer   |
|---------------------------------------|--|---|
| (Witte et al.,                        | pA35S, BASTA <sup>r</sup> 3xcMyc                         | Vektor für carboxy-terminale  |
| 2004)                                 |  | cMyc-Fusion und Überexpressi-   |
|                                       |  | on in <i>planta</i>   |
|                                       |  |   |
| pXCSG-eYFP                            | ori ColE1, ori RK2, P35S,                                | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer   |
| pXCSG-eYFP<br>(Witte et al.,          | ori ColE1, ori RK2, P35S, pA35S, BASTA <sup>r</sup> eYFP | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer<br>Vektor für carboxy-terminale                                 |
| pXCSG-eYFP<br>(Witte et al.,<br>2004) | ori ColE1, ori RK2, P35S, pA35S, BASTA <sup>r</sup> eYFP | Gateway <sup>™</sup> kompatibler binärer<br>Vektor für carboxy-terminale<br>eYFP-Fusion und Überexpressi- |

| Tabelle 2.7 | Überexpressionskonstrukte für AtCPK5 und AtCPK6 |
|-------------|---|
|-------------|---|

| Bezeichnung  | Beschreibung  |
|--|---|
| pXCSG-StrepII CPK5<br>pXCSG-StrepII CPK5 D221A<br>pXCSG-StrepII CPK5 vk<br>pXCSG-StrepII CPK5 S8A<br>pXSCG-StrepII CPK5 S8D<br>pXCSG-StrepII CPK5 T98A/S100A | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer Vektor<br>für <i>At</i> CPK5 (einschließlich mutagenisier-<br>ter Versionen S8A, S8D, T98A/S100D,<br>T98D/S100D, D221A, vk) mit C-terminaler<br>StrepII-Markierung unter Kontrolle des 35S<br>Promoters |
| pXSCG-StrepII CPK6<br>pXCSG-StrepII CPK6 D209A<br>pXCSG-StrepII CPK6 vk  | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer Vektor für<br><i>At</i> CPK6 (einschließlich mutagenisierter Ver-<br>sionen D209A, vk) mit C-terminaler StrepII-<br>Markierung unter Kontrolle des 35S Promo-<br>ters                                   |

| Bezeichnung     | Beschreibung   |
|-----------------|--|
| pXCSG-eYFP CPK5 | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer Vektor für C-<br>terminale <i>At</i> CPK5 CDS-eYFP-Fusion unter Kontrol-<br>le des 35S Promoters |
| pXCS-GUS CPK5   | Binärer Expressionsvector für das <i>E. coli</i> uidA-Gen (GUS) unter Kontrolle des nativen <i>At</i> CPK5 Promoters                       |
| pXCSG-eYFP CPK6 | Gateway <sup>TM</sup> kompatibler binärer Vektor für C-<br>terminale <i>At</i> CPK6 CDS-eYFP-Fusion unter Kontrol-<br>le des 35S Promoters |
| pXCS-GUS CPK6   | Binärer Expressionsvector für das <i>E. coli</i> uidA-Gen (GUS) unter Kontrolle des nativen <i>At</i> CPK6 Promoters                       |

 

 Tabelle 2.8 Plasmide zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression sowie intrazellulärer Lokalisation von AtCPK5 bzw. AtCPK6

## 2.5.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 2 bis 3 frische Blättchen gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das tiefgefrorene Material wurde mit einem kalten Kunststoffpistill gemörsert. Das Pulver wurde mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 1,5 % SDS) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 65 °C wurden 300  $\mu$ l 5M Kaliumazetatpuffer (60 % 5M Kaliumazetat; 11,5 % Essigsäure) zugesetzt und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden alle festen Bestandteile abzentrifugiert (10 min., 20.800 x g, 4 °C) und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800  $\mu$ l PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Verhältnis: 25:24:1) und vorsichtigem Mischen, wurde erneut zentrifugiert (5 min., 20.800 x g, 4 °C) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol die DNA gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 500  $\mu$ l 70 % Ethanol kurz gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Trocknung des Pellets dieses in 50  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

## 2.5.2.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen nach Edwarts et al.

Die für die Genotypisierung notwendige genomische DNA aus Pflanzen wurde nach einer modifizierten Version des Edwards-Protokolls (Edwards et al., 1991) durchgeführt. Dazu wurde von jeder zu untersuchenden Pflanze ein kleines Blattstück abgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 200  $\mu$ l Edwards-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS) vorgelegt waren. Das Blattmaterial wurde mit einem Handmörser zerkleinert und durch Zentrifugation (5 min., 20.800 x g, 4°C) pelletiert. 150  $\mu$ l des Überstandes wurden dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 150  $\mu$ l Isopropanol versetzt. Nach zwei minütiger Inkubation bei RT wurde die gefällte DNA durch zentrifugieren (10 min. 20.800 x g; 4°C) pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung des Pellets in 100  $\mu$ l Wasser gelöst. In PCR-Reaktionen (s. Kap. 2.5.6) wurden 1  $\mu$ l DNA-Prepäration eingesetzt.

## 2.5.3 Plasmid-Minipräparation aus E. coli

Von einer LB-Agarplatte wurden 4 ml LB-Flüssigkulturen (+ entsprechende Antibiotika) angeimpft und über Nacht unter Schüttlen (180 upm) bei 37°C inkubiert. Von diesen Flüssigkulturen wurden 2 ml pelletiert, und in 100  $\mu$ l P1 Puffer (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,1 g/l RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l des Puffers P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS), 5 min Inkubation bei RT, Zugabe von 100  $\mu$ l P3 (3 M Kaliumazetat pH 5,5) und 10 min Inkubation auf Eis, wurden die Proben zentrifugiert (15 min; 20.800 x g; RT). Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 300  $\mu$ l eiskaltem Isopropanol versetzt und für 10 min zentrifugiert (20.800 x g; RT). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets nach dem Waschen mit 70 % Ethanol und vollständigen Trocknen in 50 $\mu$ l Wasser resuspendiert.

#### 2.5.4 Agrobakterium Plasmid-Minipräparation

3 ml einer Übernachtkultur (+ 50  $\mu$ g/ml Rifampizin, 25  $\mu$ g/ml Gentamyzin, 200  $\mu$ g/ml Spectinomyzin) wurden pelletiert (3 min 1300 x g; RT), in Lösung 1 (0,45 g/ml Glukose; 0,25 M EDTA; 0,5 M Tris-Cl pH 7,5; 0,02 g/ml Lysozym) resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1 % SDS) und einer 30 min. Inkubation bei RT wurde 30  $\mu$ l alkalisches Phenol (1 ml Phenol; 60  $\mu$ l 1M NaOH) zugegeben, durch invertieren gemischt und 150  $\mu$ l Kaliumazetatpuffer (60 ml 5 M Kaliumazetat; 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml steriles Wasser) hinzugefügt. Nach Zentrifugation (10 min; 20.800 x g; RT) wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) gemischt und zentrifugiert (5 min; 20.800 x g; RT). Die wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform gemischt und zentrifugiert (5 min; 20.800 x g; RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol gefällt (5 min bei RT inkubieren), durch Zentrifugation (15 min; 20.800 x g; 4°C) pelletiert und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 50  $\mu$ l Wasser gelöst.

#### 2.5.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Nukleinsäuerekonzentrationen in Lösung wurden spektroskopisch mittels eines Spektrophotometers (Nanodrop ND-1000 (PEQLAB)) bei 260 nm ermittelt. Über die folgenden Formeln lässt sich die Konzentration der Lösung errechnen.

| dsDNA: | $E_{260}=1$ entspricht 50 $\mu$ g/ml |
|--------|--------------------------------------|
| RNA:   | $E_{260}=1$ entspricht 40 $\mu$ g/ml |

#### 2.5.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 500 pM 5'- und 3'-Primern, 0,125 mM dNTP Gemisch (Bioline), 1x *Taq*-Polymerase Puffer und 2,5 U *Taq*- bzw. 1,25 U *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Als Vorlage diente entweder 1  $\mu$ l genomische DNA (s. Kap. 2.5.2.1) oder cDNA aus einer Reversen Transkription Reaktion (s. Kap. 2.5.6.3). Das Endvolumen betrug 20  $\mu$ l. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit folgendem Programm: 2:00 min 94°C; 30-40x: 0:30 min 94°C; 0:30 min T<sub>anneal</sub>; 1:00 min pro kbp 72°C; 10:00 min 72°C und 4°C für  $\infty$ . Die Temperaturzyklen wurden mit dem Gerät PTC-200 von der Firma Biorad (München) durchgeführt.

## 2.5.6.1 Genotypisierung

Zur Überprüfung der T-DNA Insertionen in den einzelnen *Arabidopsis* T-DNA Linien, wurden PCR-Reaktionen durchgeführt mit denen zwischen WT und *Knock out* Pflanzen unterschieden werden konnte. Hierfür wurden zwei Primerpaare und zwei unabhängige PCR-Reaktionen benötigt. In der ersten PCR-Reaktion zur Detektion des WT wurden Primer verwendet, die die vorhergesagte T-DNA-Insertionsstelle genspezifisch umschließen. In der zweiten Reaktion zur Detektion des KO wird ein Primerpaar verwendet, bei

dem ein Primer spezifisch für die T-DNA-Insertion ist und der andere genspezifisch bindet (siehe hierzu auch den Anhang). Ist nur in der WT- bzw. KO-Reaktion ein Produkt zu sehen, dann besitzt die getestete Pflanze ein homozygotes WT-Gen bzw. ein homozygotes KO-Gen. Ist in beiden Reaktionen ein Produkt zu erkennen, dann ist die Pflanze Heterozygot.

## 2.5.6.2 Klonierung mit dem Gateway-System<sup>™</sup>

Zur Klonierung von Genen aus dem ENTRY-Vektor pENTR\-TOPO<sup>®</sup> in unterschiedliche binäre Expressionsvektoren wurde das Gateway<sup>TM</sup>-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\-TOPO<sup>®</sup> in gezielter Orientierung ligiert. Die Übertragung des Inserts in den Ziel-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 DH10B Zellen konnten nur transformierte Zellen überleben, die ein Plasmid trugen, welches das Insert des ENTRY-Vektors enthielt.

## 2.5.6.3 Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial für die reverse Transkription dienten 10  $\mu$ l RNA aus einer DNAse behandelten (s. Kap. 2.6.2) RNA-Präparation (s. Kap. 2.6.1). Die Erststrangsynthese erfolgte mit der M-MLV Reversen Transkriptase (Promega) nach Herstellerangaben. Die folgende PCR-Reaktion wurde mit *Taq*-Polymerase, fw. und rev. Primern und einer den Primer angepassten T<sub>anneal</sub> durchgeführt. Als Ladungskontrolle wurde ein Genfragment des Struktruproteins Actin2 in 20 Zyklen und T<sub>anneal</sub>=55°C amplifiziert. Die Menge der eingesetzten cDNA-Vorlage richtete sich nach der Stärke der PCR-Produkte in der entsprechenden Actin2 PCR.

## 2.5.7 Agarosegelelektrophorese

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, pH 8,5 in H<sub>2</sub>O) verwendet. Die DNA wurde mit 0,2 Vol. 5 x DNA-Ladepuffer (50 % (v/v) Glyzerin ; 1 mM EDTA; 0,4 % (w/v) Bromphenol Blau) gemischt und aufgetragen. Als Größenstandard diente der Hyperladder I (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 ( $\lambda = 254$  nm) sichtbar gemacht.

## 2.5.8 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Herstellerangaben (Blue Matrix Agarose Out, Roboklon) eluiert.

#### 2.5.9 Restriktionsverdau

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  $\mu$ g Plasmid-DNA in einem 20  $\mu$ l Ansatz für eine Stunde bei 37 °C mit 0,2  $\mu$ l Restriktionsenzym verdaut. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 Minuten bei 65 °C.

## 2.5.10 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. 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  $\mu$ l des DpnI behandelten PCR Ansatzes wurde in *E. coli* Zellen transformiert.

 $\frac{\text{Reaktions-Ansatz } (50 \ \mu\text{l}):}{5 \ \mu\text{l} \ 10x \ \text{Pfu-Puffer}}$ 240 \ \mu\left dNTPs (10 mM ) je 1,25 \ \mu\left Primer (10 mM) 1 \ \mu\left PfuTurbo\vert Polymerase (2,5 U/\mu\left) 10 ng Plasmid-DNA mit H\_2O auf 50 \ \mu\left l PCR-Programm: 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

## 2.5.11 Sequenzierung der DNA

Für die Sequenzierung wurde 30-100 ng Plasmid-DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (s. Kap. 2.5.3) mit den entsprechenden Primern an die Firma GATC (Konstanz) gesandt. Für die Sequenz der Primer siehe Anhang.

## 2.5.12 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit dem Programmpaket VectorNTI von Invitrogen

## 2.6 RNA-Analytik

## 2.6.1 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Um die Genexpression unter bestimmten Bedingungen zu testen, wurden Arabidopsis-Pflanzen mit dem jeweiligen Pathogen infiziert (s. Kap. 2.8.1). Nach dem Ernten der Blätter wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Nach der Zugabe von 1 ml Trizol (Invitrogen), Auftauen unter Vortexen und Phasentrennung mit 0,2 ml Chloroform wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und die Pellets luftgetrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde es mit 20-50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (Promega) gelöst.

## 2.6.2 DNAse-Verdau isolierter RNA

Zu etwa 2  $\mu$ g RNA aus einer Präparation mittels Trizol (s. Kap. 2.6.1) wurde 1x DNase Puffer und 0,5  $\mu$ l DNase (Roche 10 U/ $\mu$ l) gegeben, auf 10  $\mu$ l mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 2 mM) und Inkubation bei 65°C für 10 min gestoppt. Anschließend wurde die RNA mittels Reverser-Transkriptase in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 2.5.6.3).

## 2.7 Proteinanalytik

## 2.7.1 Proteinexpression

## 2.7.1.1 Transiente Proteinexpression in Nicotiana benthamiana

Rekombinante Proteine wurden Agrobakterium-vermittelt in N. benthamiana-Blättern exprimiert. Dafür wurden Glyzerin-Dauerkulturen der Agrobakterien 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 upm) inkubiert. Zusätzlich wurde ein A. tumefaciens-Stamm, der den Silencing-Inhibitor 19K exprimiert, angeimpft. Die Flüssigkulturen 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 MgCl<sub>2</sub>; 150  $\mu$ M Acetosyrongon; in H<sub>2</sub>O) vorsichtig resuspendiert. Die OD<sub>600</sub> 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 OD<sub>600</sub> 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.

# 2.7.1.2 Proteinreinigung Strepll-markierter Proteine nach Expression in *Nicotiana benthamiana* (Witte et al., 2004)

0,5 g Blattmaterial aus infiltrierten *N. benthamiana*-Blättern wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und 1,5 ml 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 (2 $\mu$ g/ml Antipain und 2 $\mu$ g/ml Leupeptin); 2  $\mu$ l/ml Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma, Steinheim); 10 mM NaF; 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 100  $\mu$ g/ml Avidin; 0,5 % (v/v) TritonX-100 in H<sub>2</sub>O) 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 StrepII markierten Proteine 30  $\mu$ l StrepTactin (IBA) zugegeben. Dabei interagiert der StrepII-Tag mit immobilisiertem StrepTactin, einem speziell hergestellten Streptavidin. Nach 15 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 4 °C, wurde der Rohextrakt abgenommen und das Strep-Tactin 3 x mit Waschpuffer (100 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; in H<sub>2</sub>O) gewaschen.

## 2.7.1.3 Transiente Proteinexpression in *Arabidopsis thaliana*-Mesophyllprotoplasten (Yoo et al. 2007)

Die Isolierung der Mesophyllprotoplasten erfolgte nach dem Protokoll von Yoo et al 2007. Je drei Blätter von vier Wochen alten, unter Kurztagbedingungen kultivierten Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden mit einer frischen Rasierklinge in dünne Streifen geschnitten und in 5 ml Enzymlösung (20 mM MES pH 5.7; 0,4 M Mannitol; 20 mM KCl; 1,5 % Cellulase; 0,4 % Macerozyme für 10 min bei 55 °C inkubiert, dann auf RT abgekühlt und 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,1 % BSA zugeben) gegeben. Nach 30 minütiger Vakuuminfiltration wurde die Lösung 3 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml W5-Lösung (2 mM MES, pH 5.7; 154 mM NaCl; 125 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl), Filtration der Protoplasten durch einen Nylonfilter mit 80 µm Porengröße (Neolab, Heidelberg) und Zentrifugation bei 75 x g für 2 min in einem Ausschwingrotor wurden die Zellen in W5-Lösung resuspendiert, die Zelldichte bestimmt und 30 min zur Sedimentation auf Eis inkubiert. Dann wurde der Überstand entfernt und die Zellen in einem adäquatem Volumen MMG (4 mM MES, pH 5.7; 0.4 M Mannitol; 15 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert, so dass die Zelldichte  $2x10^5$  betrug. Für die Transfektion wurden auf 15-20  $\mu$ g Plasmid-DNA (aber höchstens 20  $\mu$ l), 100  $\mu$ l Protoplastenlösung und 110 $\mu$ l PEG Lösung (40 % PEG in 0,2 M Mannitol; 100 mM CaCl<sub>2</sub>) gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 440 µl W5-Lösung gestoppt. Nach anschließender Zentrifugation bei 100 x g für 2 min wurden die Protoplasten in 1 ml WI-Lösung (4 mM MES, pH 5.7; 0.5 M Mannitol; 20 mM KCl) aufgenommen und bei Raumtemperatur in vorher mit 1 ml 5 % Kalbserum beschichteten 6-kavitäten Platten für 6 h bzw. 24 h inkubiert.

## 2.7.1.4 Proteinreinigung Strepll-markierter Proteine nach Expression in Arabidopsis thaliana-Mesophyllprotoplasten

Die Reinigung von StrepII-markierten Proteinen nach Expression in *A. thaliana*-Mesophyllprotolasten geschah analog zu der Reinigung von Proteinen aus *N. benthamiana* (2.7.1.2). Die Protoplasten wurden nach der Expression in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und pelletiert (10.000 x g; 10 s; 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Protoplasten wurden durch Zugabe von 100  $\mu$ l Lysepuffer (2,5 mM Tris-HCl pH 8.0; 2 mM DACTAA; 1 mM DTT; 1 % Glycerin; 1 % Triton X-100) lysiert. Dem Rohextrakt wurden 5  $\mu$ l StrepTactin zugefügt und 15 min im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Das Waschen der Beads erfolgte wie bei der Reinigung aus *N. benthamiana*-Blättern.

## 2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt einer Lösung wurde mit dem *Bradford proteinassay* (Biorad) mit Eichkurven auf Basis von Standardalbuminlösungen nach Angaben des Herstellers in einem Spectralphotometer  $\mu$ QuantTM (Biotek Industries, Bad Friedrichshall) bestimmt.

## 2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Laemmli (1979) als diskontinuierliche Elektrophorese nach den Anweisungen von Sambrook (1998) durchgeführt. Das Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (37,5:1) wurde als Rotiphorese Gel 30-Lösung von der Firma ROTH (Karlsruhe) bezogen. Die Proteine wurden in 10 - 15 %igen Trenngelen mit 5 %igen Sammelgelen in den Minigelelektrophoresekammern der Firma BioRad (München) bei 25 mA/Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (s. Kap. 2.7.4). Als Größenstandard wurden die *PageRuler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder* von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

## 2.7.4 Proteinfärbung mit Coomassie

Zur Kontrolle der Gelbeladung wurden die Proteingele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Lösung (0,125 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % Methanol; 10 % Essigsäure) angefärbt, mit Entfärberlösung (5 % Essigsäure) überschüssiger Farbstoff wieder entfernt und entweder auf Blottingpapier bei 80°C im Geltrockner oder nach 30-minütiger Haltbarmachung in Trockenlösung (30 % Methanol; 5 % Glyzerol; 65 % H<sub>2</sub>O) in Folie getrocknet.

## 2.7.5 Western-Blot

Mittels Western-Blot wurden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (HybondTM-ECL<sup>TM</sup>, GE-Healthcare, München) übertragen. Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in dem miniPROTEAN<sup>®</sup> 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 min Inkubation wurde die Lösung abgeschüttet und die Membran mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

## 2.7.5.1 Immunodetektion StreplI-markierter Proteine

Zur Detektion StrepII markierter Proteine wurde das Strep-Tactin HRP-(horse radish peroxidase)-Konjugat (IBA) verwendet. Die Detektion erfolgte über eine enzymatische Reaktion des an das Konjugat gebundenen Enzyms. Nach einstündiger Inkubation des Strep-Tactin HRP-Konjugats erfolgte die Detektion mittels ECL (Supersignal® West Femto bzw. Piko Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, USA).

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; 0,1 % Tween 20) gewaschen und 10 min in 2  $\mu$ g/ ml Avidin in TBS-T inkubiert, um eine unspezifische Detektion von biotinylierten Proteinen durch das StrepTactin HRP-Konjugat (IBA) zu verhindern. In diese Lösung wurde das entsprechenden StrepTactin HRP-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 mit mit dem Femto-ECL-Kit von Pierce und der Kodak Image Station 440CF.

## 2.7.5.2 Immunodetektion phosphorylierter MAP-Kinasen (TxY-Western)

Zur Detektion phosphorylierter MAP-Kinasen wurde ein TxY-Western durchgeführt. Dafür wurde die Nitrozellulosemembran 1 Stunde bei Raumtemperatur in 20 ml Blockierlösung inkubiert (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 p42/p44 von Cell Signaling (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  $\alpha$ -Kaninchen HRP-konjugiertem Antikörper (1:10.000 in 3 % Milch in 1xTBS-T) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS-T wurde die Membran mit dem Femto-ECL-Kit von Pierce entwickelt und die Proteine mit der Kodak Image Station 440CF detektiert.

#### 2.7.5.3 Immunodetektion myc-markierter Proteine

Für den Nachweis 3myc-markierter Proteine wurde die Nitrocellulosemembran mit den immobilisierten Proteinen 1 Stunde bei Raumtemperatur in 20 ml Blockierlösung inkubiert (Blockierlösung: 5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer) und 3 x kurz mit TBS-T gespült. Der  $\alpha$ -myc-Antikörper wurde 1 h bei RT in 10 ml 5% Milchpulver in TBS-T (1:5.000) inkubiert. Nach dreimaliger Waschung der Membran mit TBS-T für je 10 min wurde der Blot mit  $\alpha$ -Maus AP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:5.000) in 10 ml 5% Milchpulver in TBS-T für 1 h inkubiert. Die Proteindetektion erfolgte nach dreimaligen Wachen der Membran mit TBS-T in 10 ml AP-Puffer (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>) mit 33  $\mu$ l BCIP (50 mg/ml in DMF) und 66  $\mu$ l NBT (50 mg/ml in 70% DMF).

#### 2.7.5.4 Identifizierung von in vivo Phopshorylierungsstellen

Für die Identifizierung von in vivo Phopshorylierungsstellen wurden die StrepIImarkierten transient in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten exprimiert (2.7.1.3) und mittels Strep-Tactin affinitätschromatographisch gereinigt (2.7.1.4). Die gereinigten Proteine wurden mit SDS-Ladepuffer aufgekocht und auf ein SDS-Polyacrylamid Gel geladen (2.7.3). Nach dem Gellauf wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (2.7.4) und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden anschließend zweimal mit 1:1 H<sub>2</sub>O/Acetonitril (v/v) entfärbt. Nach 5 min Inkubation in Acetonitril bei RT waren die Gelstücke dehydriert und wurden anschließend 5 min mit 100 mM Bicarbonat bei RT rehydriert. Nach Zugabe von einem Volumen Acetonitril zum Bicarbonat (1:1 Bicarbonat/Acetonitril) und 15 min schütteln bei RT wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Reduktion und Alkylierung von Cysteinresten erfolgte durch die Zugabe von 10 mM DTT in 100 mM Bicarbonat für 45 min bei 56°C. Nach dem Abkühlen der Probe wurde das DTT verworfen und die Gelstücke in 55 mM Idoacetamid in 100 mM Bicarbonat aufgenommen und 30 min im Dunkeln inkubiert. Das Idoacetamid wurde verworfen und die Gelstücke für 15 min in 100 mM Bicarbonat bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von einem Volumen Acetronitril

(1:1 Bicarbonat/Acetonitril) und 15 min Inkubation bei RT wurden die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Für den In-Gel-Verdau wurden die Gelstücke anschließend durch die Zugabe von Trypsin (Promega 10 ng/ $\mu$ l in 50 mM Bicarbonat) rehydriert und über Nacht mit 25 mM Bicarbonat bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrrfugation und überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurden die Peptide in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die Anreicherung der Phosphopeptide wurden die getrockneten Peptide in 80% Acteonitri, 0,1 % TFA und 2mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure gelöst und für 20 min bei RT mit 5mg TiO<sub>2</sub> (Titansphere) inkubiert. Anschließend wurden das TiO<sub>2</sub> einmal mit 10% Acetonitril, 0,1 % TFA und einmal mit 80% Acetonitril, 0,1 % TFA gewaschen und anschließend mittels C8 entsalzt. Nach Elution mit 100  $\mu$ l 0,5NH<sub>4</sub>OH, 70 % Acetonitril, 0,1 % TFA und ansäuern des Ansatzes mit TFA auf ca. pH 2 wurden die Peptide in einer Vakuumzentrifuge fast komplett getrocknet und mit 8  $\mu$ l 0,5 % TFA, 5 % Acetonitril aufgenommen.

Die Analyse erfolge dann mittels LC-MS/MS mit einer nanoflow HPLC (Proxeon Biosystems) und einer linearen Ionenfalle (LTQ-Orbitrap, Thermo Scientific).

#### 2.7.5.5 Phosphatase-Behandlung

Die StrepII-markierten Proteine wurden transient in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten exprimiert (2.7.1.3) und mittels Strep-Tactin affinitätschromatographisch gereinigt (2.7.1.4). Das am Strep-Tactin gebundene Protein wurde anschließend einmal mit 1x Phosphatase-Puffer + 1x MnCl<sub>2</sub> gewaschen. Danach wurden 400 U  $\lambda$ -Phosphatase (NEB) zu dem Protein gegeben und für 20 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von SDS-Ladepuffer gestoppt und der Ansatz mittels SDS-PAGE analysiert (2.7.3)

#### 2.7.6 Kinaseaktivitätstest

#### 2.7.6.1 In-Gel-Kinase-Test

Der In-Gel-Kinase-Test der MAPK, sowie der CPKs, wurde nach He et al., 2006 durchgeführt. Die Protoplasten wurden lysiert (2.7.1.4) und der Rohextrakt über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.7.3). Dieses enthielt im Trenngel zusätzlich 0,25 mg/ml MBP (SIGMA). Nach Beendigung des Gellaufes wurde dieses dreimal für eine Stunde in Waschpuffer (25mM Tris-HCl pH 8; 0,5 mM DTT; 0,5 mM NaF; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,5 mg/ml BSA; 0,1 % Triton X-100) auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation des Geles im Renaturierungspuffer (25mM Tris-HCl pH 8; 0,5 mM DTT; 0,5 mM NaF; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) bei RT erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht, gefolgt von einer weiteren Stunde bei RT. Nach jedem Inkubationschritt erfolgte eine Erneuerung des Wasch- bzw. Renaturierungspuffers. Die Equilibrierung des Geles erfolgte für 30 min bei RT auf dem Schüttler im Reaktionsspuffer (25mM Tris-HCl pH 8; 2 mM EDTA; 12 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 25  $\mu$ M kaltem ATP (Roche) und 50  $\mu$ Ci p32- $\gamma$ -ATP (Hartmann Analytic GmbH) gestartet. Nach 1 h wurde die Reaktion durch 5 % Trichloressigsäure und 1 % Phosphorsäure gestoppt. Das Gel wurde anschließend mehrfach mit 5 % Trichloressigsäure und 1 % Phosphorsäure gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr in der Waschlösung messbar war. Nach Trocknung des Geles wurden die Banden mittels Audioradiographie visualisiert. Hierzu wurde eine Phopho-Imaging Platte (BAS-MS, Fujifilm) über Nacht auf das getrocknete Gel gelegt. Nach ausreichender Belichtungszeit erfolgte die Analyse mit dem Gerät FLA-2000G und dem Softwarepaket Science Lab 99 von Fujifilm.

## 2.7.7 Fluoreszensmikroskopie

Die subzelluläre Lokalisierung der YFP-markierten Proteine in *Arabidopsis thalina*-Pflanzen oder -Protoplasten bzw. in *Nicotiana benthamiana* erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Eclipse 90i von Nikon bei einer Extinktionswellenlänge von 480-520 nm und einer Emmisionswellenlänge von 505-565 nm. Das Mikroskop wurde mit dem Programm Volocity (Improvision) gesteuert und die Bilder mit einer Hamamatsu ORCA C4742-Kamera aufgenommen.

#### 2.7.8 Färbung von Protoplasten mit FDA und PI

Für die Untersuchung des Zelltodes erfolgte die Färbung der Protoplasten mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Prodiumiodid (PI) (FLUKA). Hierfür wurden von jedem Zeitpunkt nach der Transformation und Resuspensierung in WI Medium 10  $\mu$ l der Protoplastensuspension abgenommen und mit jeweils 50  $\mu$ g/ml der Farbstoffe versetzt. Anschließend erfolgte die Auszählung der Zellen unter dem Floureszenz-Mikroskop (Nikon Eclipse 90i). Für FDA erfolgte eine Anregung bei 500nm und die Emission bei 535nm. Für Propidiumiodid erfolgte eine Anregung bei 565nm und die Emission bei 620nm.

#### 2.7.9 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 Exsikkator dreimal für jeweils 1 min 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.

## 2.8 Phänotypische Analysen

## 2.8.1 Pathogen-Tests in planta

Ob die KO-Linen eine erhöhte oder verringerte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen im Vergleich zum Wildtyp zeigen, wurde mittels Infektion der Pflanzen mit dem Pilz *Alternaria brassicicola* und den Bakterien Stämmen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (virulent), avrRpm1 (avirulent), und hrcC- (apathogen) überprüft. Die Pflanzen wurden zu diesem Zweck sechs Wochen lang in Erde unter Kurztagbedingungen kultiviert.

#### 2.8.1.1 Alternaria brassicicola Infektion

Die Infektion mit dem Pilz *Alternaria brassicicola* geschah durch das Auftropfen von 6-8 Tropfen einer Sporensuspension mit einer Sporenzahl von 5\*10<sup>5</sup> Sporen/ml auf je zwei Blätter einer Pflanze. Die infizierten Blätter wurden dann am Tag 5 nach der Infektion auf ihre Symptome hin untersucht.

# 2.8.1.2 Bakterienwachstumsversuche mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Die verschiedenen Stämmme von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* wurden in einer 50 ml Übernachtkultur in King's B-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 28°C und 200 upm inkubiert. Vor der Infiltration wurden die Bakterien pelletiert (6 min; 1300 x g; 4°C), zweimal mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, und auf eine  $OD_{600} = 0, 2 \approx 10^8$  cfu/ml eingestellt. Für die Infiltration wurden die Zellen auf 10<sup>4</sup> cfu/ml verdünnt. An den Tagen 0, 1 und 3 nach der Infiltration wurden die Blätter geerntet. Zur Oberflächensterilisation der Blätter wurden sie für 1 min in 70% Ethanol, und anschließend kurz in Wasser gewaschen. Nach dem Abtrocknen wurde mit Hilfe eines Kork-

bohrers (3 mm Durchmesser) aus jedem Blatt zwei Blattscheiben herausgestanzt. Diese wurden in ein mit 100  $\mu$ l 10 mM MgCl<sub>2</sub> gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, und mit einem Handmörser zerkleinert. Der Handmörser wurde mit zusätzlichen 100  $\mu$ l 10 mM MgCl<sub>2</sub> abgespült. 10  $\mu$ l der Suspension wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Agar-Platten (mit den entsprechenden Antibiotika + 50 $\mu$ g/ml Cycloheximid) aufgetragen und 48 h bei 28°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden gezählt und die Zellzahl auf die jeweilige Verdünnungsstufe zurückgerechnet. Pro Zeitpunkt und Pathogen wurden jeweils zwei Blätter von drei Pflanzen inokuliert.

## 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Funktion der beiden CDPKs *At*CPK5 und *At*CPK6 bei der frühen Abwehr von Phytopathogenen untersucht werden. Voruntersuchungen in der AG Romeis hatten gezeigt, dass konstitutiv aktive Varianten dieser Kinasen, ähnlich wie es auch für die *Nt*CDPK2 beobachtet wurde, in der Lage sind, Zelltoderscheinungen nach transienter Expression in *N. benthamiana* hervorzurufen (Komander und Romeis; unveröffentlicht).

Für die nähere Charakterisierung dieser beiden Kinasen, musste für die biochemischen Analysen eine neues Expressionssystem im Labor etabliert werden, das es erlaubte, die Aktivierung der Kinasen nach Elizitierung mit Flg22 bzw. Elf18 zu testen. Des Weiteren wurden patho-physiologische Untersuchungen an T-DNA-Insertionsmutanten für *AtCPK6* durchgeführt.

## 3.1 Genotypische Analyse der verwendeten Arabidopsis-Mutanten

*Knock out*-Pflanzen sind ein wichtiges Werkzeug zur Aufklärung von Proteinfunktionen. In *Arabidopsis* lassen sich Gene durch unterschiedliche Verfahren ausschalten. Die am meisten verwendete Methode ist die Integration einer so genannten T-DNA mittels *Agrobacterium tumefaciens*. Mit dieser Methode hat das SALK-Institut (San Diego, Kalifornien) eine genomweite Mutagenisierung von *Arabidopsis thaliana* vorgenommen (Alonso et al., 2003). Neben dieser Methode können ganze Genomabschnitte auch durch Neutronenbeschuss deletiert werden (Li et al., 2001) oder Punktmutationen werden durch Ethan-Methylsulfonat (EMS)-Mutagenese induziert (Sega, 1984).

Für die patho-physiologischen Untersuchungen an *Atcpk6* KO-Pflanzen wurde die T-DNA Insertionsmutante SALK\_025460 genutzt. Diese Linie wurde vom *Notting-ham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen. Für die Analyse Flg22 und Elf18-abhängiger Signaltransduktionswege wurden, neben dem Col-0 WT, auch die T-DNA-Insertionslinien SALK\_034523 (*Atbak1-3*) und SALK\_093905 (*Atfls2*) verwendet. Diese Mutanten wurden von der AG Nürnberger (Uni Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Alle Mutantenlinien wurden vor der Verwendung in biochemischen oder physiologischen Analysen mittels PCR auf Homozygotie getestet.

Für *At*CPK5 existieren bisher keine T-DNA-Insertionen innerhalb der translatierten mRNA und es sind auch keine Deletionsmutanten beschrieben. Im Rahmen des TILLING-Projektes (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) (Henikoff et al., 2004) konnten nach EMS-Mutagenese mehrere Punktmutationen innerhalb des *CPK5*-Gens identifiziert werden (Abb. 3.1 A). Bei der Mutation 168H5 im ersten Exon handelt es sich um eine C->T Transition, welche zu einem Stopp-Codon (TAA) in der mRNA nach Aminosäure G106 führt. Allerdings ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gelungen, homozygote Pflanzen dieser Linie zu selektieren. Auch die Generierung *At-CPK5* defizienter Pflanzen mittels RNAi-Techniken war bei dreimaligen Versuchen nicht erfolgreich. Für alle anderen genutzten Mutanten-Linien konnten homozygote Pflanzen selektiert und vermehrt werden (Abb. 3.1 B).

Für die Analyse potentiell veränderter Resistenzen der transgenen Pflanzen gegenüber Pathogenen wurden die hemibiotrophen Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (virulent), AvrRpm1 (avirulent), hrcC<sup>-</sup> (apathogen) und der nekrotrophe Pilz *Alternaria brassicicola* verwendet. Diese Mikroorganismen wurden von der AG Nürnberger (Uni Tübingen) zur Verfügung gestellt.



Abbildung 3.1 Genstruktur und Genotypisierung der verwendeten Mutantenlinien: A) Schematische Übersicht über die Intron-Exon-Struktur der mutierten Gene. Die Lage der T-DNA-Insertionen für *Atcpk6, Atbak1-3 und Atfls2* sind markiert. Die roten Pfeile kennzeichnen die Primerbindestellen für die Genotypisierung. B) Für die PCR-Reaktionen wurden stichprobenartig jeweils drei Pflanzen jeder Linie ausgewählt. Die DNA wurde nach Edwards et al. 1991 isoliert und in die jeweiligen PCR-Reaktionen eingesetzt. Als Kontrolle diente isolierte DNA von drei Col-0 WT Pflanzen. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die obere Reihe zeigt jeweils das Ergebnis der PCR mit Primern die die T-DNA-Insertionstelle umschließen. Die untere Reihe zeigt jeweils die Ergebnisse mit Gen- und T-DNA-spezifischen Primern.

## 3.2 Expressionsanalysen für AtCPK5 und AtCPK6

Pflanzen exprimieren je nach Entwicklungsstadium, Organ, Gewebe und nach bestimmten Stressreizen einen definierten Satz von Genen. Mit Hilfe der Datenbank *Genevestigator* (Zimmermann et al., 2004) lassen sich die Daten von vielen unterschiedlichen *Microarray*-Experimenten nach bestimmten Genen durchsuchen.

Führt man eine Metaanalyse der Genexpression für *AtCPK5* und *AtCPK6* in Bezug auf die Expression während unterschiedlicher Entwicklungsphasen durch, so ist zu erkennen, dass *AtCPK5* über den gesamten Lebenszyklus von *Arabidopsis* fast gleich bleibend stark exprimiert wird (Abb. 3.2 A). Im Gegensatz dazu zeigt *AtCPK6* ein Expressionsmaximum in jungen Pflanzen.

Betrachtet man die Expression dieser beiden Gene in den unterschiedlichen Geweben, erkennt man, dass *AtCPK6* am stärksten in Kallusgewebe und im Hypocotyl von Keimlingen exprimiert wird. *AtCPK5* dagegen zeigt auch bei dieser Analyse eine eher gleichmäßige Expression innerhalb der unterschiedlichen Gewebe (Abb. 3.2 B).



Abbildung 3.2 Genevestigator-Analyse der Genexpression von AtCPK5 und AtCPK6 während der Entwicklung von Arabidopsis thaliana: Absolute Werte der Microarray Analysen sind in blau-weiß Farben dargestellt und auf den Maximalwert normalisiert. Der dunkelste Blauton entspricht dem maximalen Expressionspotential für jedes Gen. A) Metaprofil heat map-Analyse der Genexpression von AtCPK5 und AtCPK6 während unterschiedlichen Entwicklungsphasen. B) Metaprofil heat map-Analyse der Genexpression von AtCPK5 und AtCPK6 in verschiedenen Geweben während der Entwicklung.

Da die in Abb 3.2 dargestellten Ergebnisse allerdings aus einer Metaanalyse von vielen unterschiedlichen *Microarray*-Experimenten stammen, die nicht zwangsläufig das Ziel hatten, die Genexpression in Abhängigkeit von Alter und Gewebe zu untersuchen, ist es angebracht die Expressionsmuster der betreffenden Gene stets noch einmal im Detail zu betrachten. Zu diesem Zweck wurde ein 1404 bp langes Promoterfragment von *AtCPK5* bzw. ein 1436 bp langes Promoterfragment von *AtCPK6* im pXCSG-Vektor vor das beta-Glucuronidase (GUS) Gen kloniert und mittels *Agrobacterium* in Col-0 Pflanzen eingebracht.



Abbildung 3.3 GUS-Färbung von P<sub>cpk5</sub>:GUS exprimierenden Arabidopsis thaliana-Pflanzen:
A) 4 Tage alter Keimling; B-F)
2 Wochen alte Pflanze (B) mit Nahaufnahme der Wachstumszone (C), der Blätter (C-D), der Übergangszone von Wurzel zu Spross (E) und der Wurzelspitze (F); G-J) 4 Wochen alte Pflanze (G) mit Nahaufnahme der Blüten (H), Blätter (I) und der Wurzelspitze (J) *AtCPK5* wird über den gesamten Lebenszyklus in fast allen Organen exprimiert (Abb. 3.3). Sehr starke Färbungen konnten in jungen, sich entwickelnden Geweben beobachtet werden (Abb. 3.3 C; F; J). Besonders auffällig war ein schmaler Bereich im Wurzel-Spross-Übergang (Abb. 3.3 E). In den Blüten war, bis auf eine leichte Färbung in noch geschlossenen Blüten, keine GUS-Aktivität zu erkennen (Abb. 3.3 H).



Abbildung 3.4 GUS-Färbung von P<sub>cpk6</sub>:GUS exprimierenden Arabidopsis thaliana-Pflanzen:
A) 4 Tage alter Keimling; B-F)
2 Wochen alte Pflanze (B) mit Nahaufnahme der Übergangszone von Wurzel zu Spross (C), eines Blattes (D), und der Wurzelspitze (E); F-I) 4 Wochen alte Pflanze (F) mit Nahaufnahme der Blüten (G), eines Blattes (H) und der Wurzelspitze (I)

Bei der  $P_{cpk6}$  gesteuerten GUS-Expression war im Vergleich zu den *Genevestigator*-Daten ein deutlicher Unterschied auszumachen. Nach der GUS-Färbung wird *AtCPK6* zum überwiegenden Teil nur in der Wurzel exprimiert (Abb. 3.4). In den Blättern konnte nur an den Hydathoden und Leitgeweben eine Färbung beobachtet werden (Abb 3.4 D; H). Auch für die *AtCPK6* war im Bereich des Wurzel-Spross Übergangs eine Expression nachzuweisen. Diese fiel aber weniger stark aus als es für *AtCPK5* zu beobachten war (Abb. 3.4 C). Im Gegensatz zu *AtCPK5* konnte für *AtCPK6* aber eine Expression in den Fruchtblättern und den Staubblättern nachgewiesen werden (Abb. 3.4 G). Des Weiteren konnte sowohl für *AtCPK5* als auch für *AtCPK6* eine Expression in Schließzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

## 3.2.1 Expressionsanalysen nach Pathogenstress

Da aus Vorarbeiten im Labor der AG Romeis bekannt ist, dass die beiden Proteine *At*CPK5 und *At*CPK6 in einem *gain-of-function*-Ansatz in der Lage sind, ähnlich wie *Nt*CDPK2 (Romeis et al., 2001), nach heterologer Expression in *Nicotiana benthamiana* zelltodähnliche Symptome hervorzurufen (Komander, Witte und Romeis; unveröffentlicht), wurde untersucht, ob die Expression der für *At*CPK5 und *At*CPK6 kodierenden Gene durch Pathogenbefall verändert wird.



Abbildung 3.5 Expressionsanalyse von AtCPK5 und AtCPK6 nach Infektion mit Pseudomonas syringae pv. tomato: Arabidopsis thaliana Col-0 Pflanzen wurden mit 10<sup>8</sup> cfu/ml Pst DC3000 bzw. Pst hrcC<sup>-</sup> infiltriert. Als Kontrolle wurden Blätter mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert oder nicht behandelt. Die Proben für die RNA-Isolierung und RT-PCR wurden 2, 6, 24 und 30h nach Infiltration genommen. Als Ladungskontrolle für die PCR-Reaktionen wurden Actin-spezifische Primer verwendet. Die Uhr zeigt die Probenahmen relativ zum Tag/Nacht-Rhythmus.

Zu diesem Zweck wurden *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen mit dem virulenten Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und der apathogenen Typ-III-Sekretionsmutante (TTSS) *Pst* hrcC<sup>-</sup> infiltriert. Die infiltrierten Blätter wurden zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 6h, 24h und 30h nach Infektion geerntet. Die Expression von *At-CPK5* und *AtCPK6* wurde mittels RT-PCR untersucht.

Weder für *AtCPK5* noch für *AtCPK6* konnte eine Änderung der Transkriptmenge durch *Pst* DC3000 oder hrcC<sup>-</sup> beobachtet werden (Abb. 3.5). Es fiel allerdings auf, dass die Expression beider Gene von der Tageszeit abhängt. Zu den Zeitpunkten 0h, 2h und 24h nach Infektion war bei allen Behandlungen die geringste Transkriptmenge nachzuweisen. Im Gegensatz dazu stieg die Transkriptmenge 6h nach dem Einschalten der Beleuchtung (6h und 30h nach Infektion) relativ stark an.

Mit Hilfe der Datenbank *Genevestigator* wurden auch die Expressionsmuster von *AtCPK5* und *AtCPK6* nach Behandlung mit *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) untersucht. In Abb. 3.6 ist zu erkennen, dass die Transkriptmenge von *AtCPK5* keine Veränderung nach Behandlung mit Flg22 (Bestandteil bakterieller Flagellen), HrpZ (Bestandteil des TTSS), LPS (Lipopolysaccharide) und NPP1 (*necrosis-inducing Phytophthora protein 1*) zeigt. Im Gegensatz dazu ist bei *AtCPK6* 4h nach Behandlung mit Flg22 und HrpZ eine ca. 2- bzw. 3-fache Induktion der Expression zu erkennen. Die Behandlung mit LPS und NPP1 führte aber auch bei *AtCPK6* zu keiner Veränderung der Transkription.



Abbildung 3.6 *Microarray*-Analysen der *AtCPK5* und *AtCPK6* Expression nach Inokulation von verschiedenen Elizitoren: Induktion der Expression von *AtCPK5* und *AtCPK6* nach Behandlung mit den Elizitoren Flg22, HrpZ, LPS und NPP1. Für HrpZ und Flg22 diente H<sub>2</sub>O als Kontrolle. Bei NPP1 wurde als Kontrolle eine Präparation aus GST enthaltender Vektorkontrolle inokuliert und für LPS diente Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-Lösung als Kontrolle. Die absoluten Werte der jeweiligen Signalstärken wurden aus der *Genevestigator*-Datenbank kopiert und durch die Werte der Kontrollen dividiert.

## 3.3 Subzelluläre Lokalisation von AtCPK5 und AtCPK6

Für die Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von *At*CPK5 und *At*CPK6 wurden die Gene der CPKs C-terminal mit dem Gen für das Gelb-Fluoreszierende-Protein (YFP) fusioniert. Die Fusionsproteine wurden anschließend unter der Kontrolle des 35S-Promoters transient in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten oder *N. benthamiana*-Blättern exprimiert bzw. stabil in *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT transformiert. Die Lokalisation der Proteine wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Das *At*CPK5-YFP-Fusionsprotein zeigte sowohl eine Membran- als auch cytoplasmatische Lokalisierung (Abb. 3.7). In Abb. 3.7 A ist zu erkennen, dass das Protein sowohl um die Chloroplasten herum als auch in der Plasmamembran von Mesophyll-Protoplasten zu finden ist. In Plasmolyseexperimenten (Abb. 3.7 B) waren deutlich die sich von der Zellwand zurückziehende Plasmamembran, als auch die Hecht'schen Fäden zu erkennen.



Abbildung 3.7 Subzelluläre Lokalisation von *At*CPK5: A) Transiente Expression in Mesophyll-Protoplasten. Die Aufnahme wurde 6h nach Transfektion aufgenommen. B) Plasmolyse von Epidermiszellen stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen. Das Blatt wurde mit 850 mM NaCl + 0,01% Silwet L70 eingedeckelt. Die Aufnahme wurde nach ca. 10 min Inkubation gemacht. A) + B) PM markiert die Plasmamembran, ZW die Zellwand und Chl die Chloroplasten. Rote Pfeile kennzeichnen die Hecht'schen Fäden (HF). Die weißen Größenstandards entsprechen 10  $\mu$ m.

Für das *At*CPK6-YFP-Fusionsprotein konnte eine der *At*CPK5 sehr ähnliche Lokalisierung beobachtet werden (Abb. 3.8). Auch hier wurde ein Fluoreszenzsignal um die Chloroplasten von Mesophyll-Protoplasten herum beobachtet. Da keine stabil transformierten *At*CPK6-YFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen zur Verfügung standen, wurden die Plasmolyseexperimente an *At*CPK6-YFP transient exprimierenden *N. benthamiana*-Blättern durchgeführt (Abb. 3.8 B). Wie schon für *At*CPK5 konnten auch hier das Zurückweichen der Plasmamembran von der Zellwand und die Hecht'schen Fäden beobachtet werden.



Abbildung 3.8 Subzelluläre Lokalisation von AtCPK6: A) Transiente Expression in Mesophyll-Protoplasten. Die Aufnahme wurde 6h nach Transfektion aufgenommen. B) Plasmolyse von Epidermiszellen transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter. Das Blatt wurde mit 850 mM NaCl + 0,01% Silwet L70 eingedeckelt. Die Aufnahme wurde nach ca. 10 min Inkubation gemacht. A) + B) PM markiert die Plasmamembran, ZW die Zellwand, ZK den Zellkern und Chl die Chloroplasten. Rote Pfeile kennzeichnen die Hecht'schen Fäden (HF). Die weißen Größenstandards entsprechen 10 μm.

## 3.4 Biochemische Analysen von AtCPK5 und AtCPK6

# 3.4.1 Transiente Proteinexpression und Flg22-Behandlung in *N. benthamiana*

Pflanzen reagieren auf Pathogenbefall unter anderem mit einem sehr raschen Einstrom von Calcium in die Zelle (Lecourieux et al., 2006). Von *Nt*CDPK2 ist bereits bekannt, dass die Phosphorylierungen der Kinase wichtig für deren Aktivierung sind (Romeis et al., 2001, Witte und Romeis, unveröffentlicht). Diese Phosphorylierungen können in einigen Fällen durch SDS-PAGE nachgewiesen werden, da phosphorylierte Proteine ein verändertes Laufverhalten aufweisen können (Peck, 2006). Daher wurde die biochemische Modifikation bzw. Aktivität der *At*CPK5 und *At*CPK6 nach Pathogenbefall bzw. Elizitierung untersucht.

Zuerst wurden die Proteine transient in *N. benthamiana* exprimiert. Die transiente Proteinexpression in *N. benthamiana* eignet sich, um große Mengen Protein herzustellen. Gegenüber bakteriellen Expressionssystemen bietet es den Vorteil, dass pflanzenspezifische post-translationale Modifikation an den Proteinen vorgenommen werden können. Damit das Protein der Wahl in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert werden kann, werden Agrobakterien mit einem binären-Vektor transformiert und anschließend in die Blätter injiziert. Sie sorgen dafür, dass der Vektor in die Pflanzenzellen transferiert wird.

Mit dieser Methode wurden die beiden CDPKs AtCPK5, AtCPK6 und deren jeweilige Kinase-inaktive Varianten in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert. Anschließend wurden diese Blätter für 10 bzw. 30 min mit 1  $\mu$ M Flg22 infiltriert. Die Proteine konnten anschließend affinitätschromatographisch gereinigt und für Western-Blot-Analysen bzw. für *in vitro*-Kinase-Tests verwendet werden (Abb. 3.9).

Für *At*CPK5 war in der Western-Blot-Analyse eine Doppelbande zu beobachten, die bei der Kinase-inaktiven Variante dieses Proteins wesentlich schwächer ausgeprägt war. Bei der höher laufenden Bande handelt es sich sehr wahrscheinlich um die phosphorylierte Form der *At*CPK5. Für *At*CPK6 war sowohl beim WT-Protein als auch bei der Kinase-inaktiven Variante nur eine Bande zu erkennen (Abb. 3.9 A).

Im *in vitro*-Kinase-Test zeigte sich, dass die Aktivität beider Kinasen Calciumabhängig ist, wobei auch eine geringe Restaktivität in den mit EGTA behandelten Proben festzustellen war (Abb. 3.9 B-C). Beide Kinasen waren in der Lage sowohl sich selbst, als auch das Substrat (Histon) zu phosphorylieren. Es ließ sich jedoch keine Änderung der Kinaseaktivität nach *in vivo* Flg22-Applikation erkennen. Auffällig ist jedoch, dass nur die obere Bande der *At*CPK5 eine deutliche Kinaseaktivität aufwies.



Abbildung 3.9 In vitro-Kinase Test nach transienter Expression von AtCPK5 und AtCPK6 in N. benthamiana und nach Flg22-Behandlung: AtCPK5, AtCPK6 und deren jeweiligen Kinase-inaktiven Varianten wurden mittels Agrobakterien-Transformation in N. benthamiana exprimiert. Drei Tage nach der Transformation wurden die transformierten Blätter mit 1 μM Flg22 infiltriert. Anschließend wurden nach 0, 10 bzw. 30 min Blattscheiben aus den mit Flg22-behandelten Blättern ausgestanzt, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und die StrepII-markierten Proteine mittels StrepTactin gereinigt. A) Western-Blot gegen die StrepIImarkierten Proteine. B-C) in vitro-Kinase-Test der gereinigten AtCPK5 und AtCPK6 Proteine mit Histon als Substrat. Die jeweilige untere Teilbild zeigt das Coomassie-gefärbte Histon nach Trennung der Proteine durch SDS-PAGE.

Um sicherzustellen, dass nicht die Proteinreinigung die Kinaseaktivität verfälscht, wurde nach der Proteinexpression in *N. benthamiana* ein In-Gel-Kinase-Test durchgeführt. Bei diesem Test werden die Proteine nach der Extraktion ohne weitere Behandlung direkt auf ein SDS-Gel geladen, in dessen Matrix ein Substrat (normalerweise Histon oder *myelin basic protein* MBP) eingegossen wurde. Nach der Gelelektrophorese werden die Proteine im Gel renaturiert und anschließend eine Kinasereaktion mit radioaktiv markiertem ATP durchgeführt.

In Abb. 3.10 ist ein solcher In-Gel-Kinase-Test für *At*CPK5 gezeigt. Um zu testen, ob eventuell Flg22 alleine nicht in der Lage ist die Kinaseaktivität der *At*CPK5 zu beeinflussen, wurden die *At*CPK5 exprimierenden Blätter neben H<sub>2</sub>O und Flg22 (Abb. 3.10 A) zusätzlich mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. dem Bakterium *Pst* DC3000 infiltriert (Abb. 3.10 B). H<sub>2</sub>O und MgCl<sub>2</sub> dienten jeweils als Negativ-Kontrollen.

Die Kontrolle der Expression erfolgte mittels Westen-Blot. Auch hier war eine Doppelbande für *At*CPK5 nachzuweisen. Die Kinaseaktivität der *At*CPK5 war jedoch völlig unabhängig von der Art und dem Zeitpunkt der Behandlung. Alle Proben wiesen eine vergleichbar starke Kinaseaktivität auf.



Abbildung 3.10 In-Gel-Kinase-Test von StrepII-markierter AtCPK5 nach Expression in N. benthamiana und Flg22 bzw. Pst DC3000 Infiltration: AtCPK5 wurde mittels Agrobakterien-Transformation in N. benthamiana exprimiert. Drei Tage nach der Transformation wurden die Blätter mit H<sub>2</sub>O bzw. 1 μM Flg22 oder mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 10<sup>8</sup> cfu/ml Pst DC3000 infiltriert. Anschließend wurden nach den angegebenen Zeitpunkten Blattscheiben aus den behandelten Blättern ausgestanzt und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach der Proteinextraktion wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. A) In-Gel-Kinase-Test und Western-Blot für AtCPK5 nach Flg22-Stress. B) In-Gel-Kinase-Test und Western-Blot für AtCPK5 nach Pst DC3000-Behandlung

## 3.4.2 Transiente Proteinexpression in Mesophyll-Protoplasten von Arabidopsis thaliana

Die transiente Proteinexpression in *N. benthamiana*-Blättern ist zwar eine leicht zugängliche Methode für biochemische Untersuchungen, hat aber, gerade für die Untersuchung von biotischen Stressen, den großen Nachteil, dass die Transformation der Zellen durch Agrobakterien vermittelt wird. Die transiente Transfektion von *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten bietet dagegen den Vorteil, dass keine Mikroorganismen für den Gentransfer benötigt werden. Zudem wurde dieses System schon erfolgreich bei der Aufklärung der Pathogen-induzierten MAP-Kinase-Signaltransduktion (Asai et al., 2002) und der Untersuchung von bakteriellen Effektorproteinen eingesetzt (He et al., 2006). Darüber hinaus bietet dieses System den Vorteil, dass man bei der Untersuchung von *Arabidopsis*-Proteinen in einem homologen System arbeitet.

Da dieses Expressionssystem jedoch noch nicht im Labor der AG Romeis angewendet wurde, musste das gesamte System zuerst etabliert werden. Hierbei ist es essentiell, geeignete Bedingungen für eine möglichst saubere Protoplastenpräparation und Plasmid-DNA-Isolierung zu finden. Diese beiden Faktoren sind entscheidend für eine hohe Transfektionseffizienz. Diese ist wichtig um zum einen genug Protein für die biochemischen Tests zu erhalten und zum anderen um eventuell auftretende physiologische Effekte überhaupt nachweisen zu können.



Abbildung 3.11 Fluoreszenzmikroskopie von YFP-exprimierenden A. thaliana Mesophyll-Protoplasten: Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden Mesophyll-Protoplasten mit einem pXCSG-35S:YFP-Konstrukt transfiziert. 6h nach Transfektion wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression des YFP-Proteins hin untersucht.

Zur Feststellung der Transfektionseffizienz wurden die Mesophyll-Protoplasten mit einem pXCSG-35S:YFP-Konstrukt transfiziert. 6h nach Transfektion wurden die fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen gezählt und so die Transfektionsrate bestimmt (Abb. 3.11). Nach einigen Anpassungen konnte das System soweit eingestellt werden, dass routinemäßig Transfektionsraten von 70-80% erreicht wurden.

## 3.4.3 Elizitierung mit Flg22 nach Expression in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten

Im zweiten Schritt wurden *At*CPK5 und *At*CPK6 bzw. deren Kinase-inaktiven Varianten (-mut) in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Nach der Expression wurden die Zellen für 10 min mit 200 nM Flg22 behandelt. Abb. 3.12 zeigt einen Western-Blot zur Detektion der StrepII-markierten Proteine. *At*CPK6 zeigte nur eine geringfügige Veränderung im Laufverhalten nach Behandlung mit Flg22. Auch beim Vergleich der aktiven und inaktiven Varianten der *At*CPK6 waren nur kleine Unterschied auszumachen.

Bei der *At*CPK5 fielen jedoch wieder die zwei deutlich von einander unterscheidbaren Banden auf. Auffällig war weiterhin, dass die Menge an Protein in der unteren Bande nach Elizitierung im Vergleich zu der oberen Bande abnimmt. Bei der Kinase-inaktiven Variante ist dieser Effekt nicht zu beobachten.



Abbildung 3.12 Western-Blot gegen StrepII-markierte AtCPK5 und AtCPK6 nach Expression in Arabidopsis-Protoplasten: Arabidopsis-Protoplasten wurden nicht (H<sub>2</sub>O), oder mit AtCPK5, AtCPK5 Kinase-inaktiv (CPK5-mut), AtCPK6 und AtCPK6 Kinase-inaktiv (CPK6-mut) transfiziert. 6h nach Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 200 nM Flg22 behandelt, pelletiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteine im Extrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die StrepII-markierten Proteine mittels HRP-konjugiertem Strep-Tactin nachgewiesen.

Die an der Regulation von abiotisch verursachten Stressreaktionen beteiligte *At*CPK21 (Franz, 2008) zeigte wie *At*CPK6 keine Veränderung im Laufverhalten nach Elizitierung mit 200 nM Flg22.

Für den Nachweis, dass es sich bei der oberen Bande tatsächlich um eine phosphorylierte Form der *At*CPK5 handelt, wurde die Kinase in Mesophyll-Protoplasten exprimiert, und den Zellen 6h nach Transfektion entweder 10 min 200 nM Flg22 oder Wasser zugesetzt. Das StrepII-markierte *At*CPK5-Protein wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt und mit einer Phosphatase *in vitro* inkubiert.



Abbildung 3.13 Phosphatasebehandlung von StrepII-markiertem AtCPK5: Arabidopsis-Protoplasten wurden mit CPK5 und der CPK5 Kinase-inaktiven Variante (CPK5-mut) transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 200 nM Flg22 behandelt, pelletiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach der Lyse der Zellen wurde das Strep-markierte Protein mittels Affinitätschromatographie gereinigt und mit  $\lambda$ -Phosphatase (+) inkubiert. Das auf Nitrocellulose transferierte Protein wurde mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin nachgewiesen.

Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Der Proteinnachweis erfolgte mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin. Es zeigte sich, dass nur in den Proben zwei Banden zu sehen waren, die nicht mit der Phosphatase behandelt wurden (Abb. 3.13).

#### 3.4.3.1 Induktion der Kinaseaktivität durch Elizitierung

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob die beobachtete Phosphorylierung der CPKs auch zu einer veränderten Kinaseaktivität führt, wurde ein In-Gel-Kinase-Test durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert und für 10 bzw. 30 min, mit 200 nM Flg22 inkubiert. Nach der Ernte und Lyse der Zellen wurden die Proteine aus dem Rohextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für den In-Gel-Kinase-Test wurde *myelin basic protein* (MBP) als Substrat in die Acrylamid-Gelmatrix eingegossen.

Sowohl für *At*CPK5 als auch für *At*CPK6 konnte eine Zunahme der Kinaseaktivität bereits 10 min nach Flg22-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Diese verstärkte Kinaseaktivität konnte für beide Proteine auch noch nach 30 min beobachtet werden. Eine Kinaseaktivität für die Kinase-inaktiven Varianten von *At*CPK5 und *At*CPK6 war nicht zu erkennen. Im Western-Blot zeigten sich jedoch für *At*CPK6 vergleichbare und für *At*CPK5 sogar größere Proteinmengen der Kinase-inaktiven Form im Vergleich zu den aktiven Proteinen 3.14.



Abbildung 3.14 In-Gel-Kinase-Test nach Flg22-Behandlung: Arabidopsis-Protoplasten wurden mit CPK5, CPK5 Kinase-inaktiv (CPK5-mut), CPK6 und CPK6 Kinase-inaktiv (CPK6-mut) transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 0, 10 bzw. 30 min mit 200 nM Flg22 behandelt, pelletiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nach der Lyse der Zellen wurden jeweils 18  $\mu$ l Rohextrakt auf ein Acrylamid-Gel mit eingegossenem MBP (obere Reihe) und einem Acrylamid-Gel ohne Substrat für eine Western-Blot Analyse (untere Reihe) aufgetragen. Die radioaktiven Signale des In-Gel-Kinase-Tests wurden mittels *Phosphoimager Screen* detektiert.

Für die genauere Untersuchung des Aktivierungszeitpunktes nach Flg22-Behandlung und der Dauer der Aktivierung von AtCPK5, wurden die aktive und inaktive Kinase in Mesophyll-Protoplasten exprimiert und die Zellen für 5, 10, 30 und 60 min mit 200 nM Flg22 inkubiert. Da, wie in Abb. 3.14 zu erkennen ist, die Aktivierung der Kinase mit der Phosphorylierung einhergeht, wurde in diesem Fall nur ein Western-Blot durchgeführt.



Abbildung 3.15 Zeitlicher Ablauf der Aktivierung von AtCPK5 durch Flg22: Arabidopsis-Protoplasten wurden mit CPK5 und der Kinase-inaktiven Form (CPK5-mut) transfiziert. 6h nach Transfektion wurden die Zellen für 0, 5, 10, 30 bzw. 60 min mit 200 nM Flg22 behandelt, pelletiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Proteine im Rohextrakt wurden in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Die StrepIImarkierten Proteine wurden mit HRP-konjugierten Strep-Tactin nachgewiesen.

Auch in Abb. 3.15 ist wieder sehr deutlich die Veränderung der Bandenverteilung nach Flg22-Behandlung zu sehen. Diese war schon 5 min nach Flg22-Zugabe zu beobachten und blieb für 30 min bestehen. Erst nach 60 min konnte eine leichte Zunahme der nicht phosphorylierten Form beobachtet werden. Für das Kinase-inaktive Proteine konnte über den gesamten Zeitraum keine Veränderung des Bandenmusters zwischen phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form festgestellt werden.

Um auszuschließen, dass die durch Flg22 beobachtete Aktivierung der *At*CPK5 durch einen unspezifischen Effekt hervorgerufen wird, wurden zusätzlich zum Col-0 WT auch Mesophyll-Protoplasten aus *fls2* und *bak1-3* Rezeptor-Mutanten hergestellt, mit *At*CPK5 transfiziert und mit Flg22 inkubiert.

Die Proteine, die in den Col-0 WT Protoplasten exprimiert wurden, zeigten das bereits beobachtete veränderte Bandenmuster nach Flg22-Behandlung. Im Gegensatz dazu war bei dem Protein, das in den Protoplasten aus der *fls2*-Mutante exprimiert wurde, keine Veränderung des Bandenmusters nach Flg22-Behandlung im Vergleich zu den nicht elizitierten Zellen zu erkennen. Nach der Flg22-Behandlung von *At*CPK5 exprimierenden *bak1-3*-Protoplasten konnte nur eine sehr leichte Verschiebung des Bandenmusters beobachtet werden (Abb. 3.16).



Abbildung 3.16 Flg22-spezifische Induktion der AtCPK5-Phosphorylierung: Protoplasten aus *fls2* und *bak1-3*-Mutanten wurden mit CPK5 und der Kinase inaktiven Form (CPK5-mut) transfiziert. 6h nach Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 200 nM Flg22 (+) bzw. H<sub>2</sub>0 behandelt, pelletiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Proteine im Rohextrakt wurden in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Die StrepII-markierten Proteine wurden mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin nachgewiesen.

Neben Flagellin gibt es noch weitere bakterielle Elizitoren. Daher wurde auch untersucht, inwieweit Elf18 (ein 18 Aminosäuren langes Peptid des Elongationsfaktors Tu) in der Lage ist, die Aktivität von *At*CPK5 zu verändern. Zu diesem Zweck wurden die
*At*CPK5 exprimierenden Protoplasten aus Col-0 WT, *fls2* und *bak1-3* parallel zur Elizitierung mit Flg22 auch mit Elf18 behandelt. Elf18 induzierte sowohl in den Col-0 WTals auch in den *fls2*-Protoplasten die Phosphorylierung von *At*CPK5. Nach Expression in *bak1-3*-Protoplasten konnte jedoch, wie nach der Behandlung mit Flg22, nur eine sehr schwache Phosphorylierung von *At*CPK5 nach Elf18-Elizitierung beobachtet werden (Abb. 3.16).

#### 3.4.4 Untersuchungen von gain-of-function-Varianten

Die Expression der *gain-of-function*-Varianten *At*CPK5 VK und *At*CPK6 VK in *N. benthamiana*-Blättern führte ohne jeden exogenen Stimulus zu HR-ähnlichen Zelltoderscheinungen (Komander, Witte und Romeis; unveröffentlicht). Es stellte sich also die Frage, wie *Arabidopsis*-Zellen auf die Expression der VK-Varianten reagieren.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden zum einen das VK-Konstrukt von *At*CPK5 und der Kinase-inaktiven Form zusammen mit einem Kontrollprotein aus dem Stickstoff-Recycling Metabolismus (*At*AAH) bzw. dem bakteriellen Effektorprotein AvrPto kotransfiziert. Die Zellen wurden 6h bzw. 16h nach Transfektion geerntet und die Proteinmengen mittels Western-Blot verglichen.



Abbildung 3.17 Ko-Transfektion der AtCPK5 VK mit AtAAH und AvrPto: Col-0 WT-Protoplasten wurden mit AtCPK5 und der Kinase inaktiven Form (CPK5-mut) transfiziert. 6h (A) und 16h (B) nach Transfektion wurden die Zellen pelletiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Proteine im Rohextrakt wurden in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Die StrepII-markierte AtCPK5 wurde mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin nachgewiesen. Die myc-markierten Proteine AvrPto und AtAAH wurden mit einem  $\alpha$ -myc-Antikörper und AP-konjugiertem sekundären Antikörper nachgewiesen. 16h nach Transfektion war in den Proben mit aktiver *At*CPK5 VK eine drastische Reduktion der Proteinmenge für *At*AAH und AvrPto im Vergleich zu den Proben mit der inaktiven Kinase zu beobachten (Abb. 3.17 B). Dieser Effekt war 6h nach Transfektion noch nicht zu beobachten (Abb. 3.17 A). Sowohl die Kinase-aktive als auch die Kinaseinaktive Form der *At*CPK5 VK waren 6h und 16h nach Transfektion nachzuweisen. Auffallend ist hier, dass die aktive Kinase im Vergleich zu der inaktiven Kinase auch ohne extrazellulären Stimulus ein verändertes Laufverhalten im Acrylamid-Gel aufwies.

Als ein zweiter Ansatz zur Untersuchung der zelltodinduzierenden Eigenschaft von *At*CPK5 VK wurde die Färbung von transfizierten Protoplasten mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidium-Iodid (PI) durchgeführt. Fluoreszin ist in seiner acetylierten Form ein nicht fluoreszierendes Molekül, welches in der Lage ist, durch die Plasmamembran in das Zellinnere zu gelangen. Dort werden die Acetat-Reste von Esterasen abgespalten und es entsteht ein grün fluoreszierender Farbstoff. PI interkalliert mit DNA und wird dadurch zu einem rot fluoreszierendem Farbstoff. Allerdings ist PI nicht in der Lage intakte Plasmamembranen zu durchdringen. Daher färbt PI nur die DNA von lysierten, toten Zellen.



Abbildung 3.18 FDA/PI-Färbung von transfizierten Protoplasten: Col-0 WT-Protoplasten wurden nicht (H<sub>2</sub>O) oder mit *At*CPK5 VK bzw. dessen Kinase-inaktiver Form transfiziert (VK-mut). Die Zellen wurden direkt (0h), 6h, 12h und 18h nach der Transfektion mit 50  $\mu$ g/ml FDA und 50  $\mu$ g/ml PI angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die angegebenen Werte zeigen den Anteil der toten Zellen.

Die Zellen, welche die aktive Kinase (*At*CPK5 VK) exprimierten, zeigten bereits 12h nach Transfektion einen leichten Anstieg toter Zellen (ca. 20%, Abb. 3.18). 18h nach Transfektion stieg dieser Wert auf ca. 80% an. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil toter Zellen bei den nicht transfizierten bzw. den Kinase-inaktiven Protein exprimierenden Zellen bis 12h bei ca. 15% und stieg nach 18h nur auf ca. 20%.

### 3.4.4.1 Wechselwirkung mit MAP-Kinasen

Seit längerem ist bekannt, dass die Bindung von Flg22 an den Flagellinrezeptor FLS2 zu einer Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade führt (Asai et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, das *Nt*CDPK2 VK die Aktivierung dieser für die Pathogenabwehr wichtigen MAP-Kinasen verändert (Ludwig et al., 2005). Aus diesem Grund wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen in Abhängigkeit von der Expression der *At*CPK5 VK bzw. *At*CPK6 VK und Flagellin-Stress untersucht.

MAP-Kinasen werden durch Phosphorylierungen an einer konservierten Aminosäuresequenz (TxY) im *activation-loop* innerhalb ihrer Kinase-Domäne aktiviert (Nühse et al., 2000). Diese Phosphorylierung wird durch Flg22 induziert und kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.



Abbildung 3.19 MAP-Kinase-Aktivierung nach Flg22-Behandlung in Abhängigkeit von der Expression verschiedener CPKs: A+B) Col-0 WT-Protoplasten wurden mit H<sub>2</sub>O, AtCPK5 VK, AtCPK6 VK und deren Kinase-inaktiven Varianten sowie der AtCPK28 VK transfiziert. 6h nach Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 200 nM Flg22 behandelt. Im unteren Teil ist jeweils die Ponceau-S gefärbte RuBisCO als Ladungskontrolle dargestellt. A) Die StrepII-markierten CPKs wurden mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin nachgewiesen. B) Der Nachweis der phosphorylierten MAP-Kinasen wurde mit einem TxY-spezifischen primären Antikörper (p42/p44 von Cell Signaling) und einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper durchgeführt.

*Arabidopsis*-Protoplasten wurden mit *At*CPK5 VK, *At*CPK6 VK und ihren Kinaseinaktiven Varianten transfiziert und 6h später für 10 min mit 200 nM Flg22 inkubiert. Anschließend wurde ein Western-Blot gegen die StrepII-markierten CPK-Proteine und die phosphorylierten MAP-Kinasen durchgeführt (Abb. 3.19). Bei allen Transfektionen ist eine Phosphorylierung des *activation-loops* der MAP-Kinasen *At*MPK3 und *At*MPK6 durch die Zugabe von Flg22 nachzuweisen (Abb. 3.19 unten). Es fällt allerdings auf, dass diese Phosphorylierung der MAP-Kinasen in den Zellen, welche die *At*CPK5 VK exprimieren, schwächer ausfiel, als in den Zellen, in denen die Kinase-inaktive *At*CPK5 oder die *At*CPK6 VK Varianten exprimiert wurden.

Da die VK-Varianten der CPKs deregulierte und konstitutiv-aktive Kinasen darstellen, wurde zur Überprüfung der Spezifität des beobachteten Effekts die konstitutiv-aktive Form von *At*CPK28 in den Test mit einbezogen. Hier konnte kein Unterschied in der MAP-Kinase-Aktivierung im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.19 unten).

## 3.4.5 Charakterisierung und Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in *At*CPK5

2006 publizierten Hegeman et. al mehrere *in vitro*-Autophosphorylierungsstellen von rekombinant in *E. coli* synthetisierten CDPKs aus *Arabidopsis thaliana*, unter anderem auch für die *At*CPK5. Sie identifizierten eine Autophosphorylierung an der Aminosäure S8 und zwei potentielle Phosphorylierungen an den Aminosäuren T98 und S100. Für letztere Aminosäuren konnten sie jedoch keine Aussage darüber machen, ob nur eine oder aber beide Aminosäuren phosphoryliert werden. Um die Auswirkungen dieser *in vitro* identifizierten Phosphorylierungsstellen auf die Aktivierung der *At*CPK5 nach Flg22-Induktion zu testen, wurden die Aminosäureaustausche S8A, S8D und T98A/S100A vorgenommen, die jeweiligen Proteine in Mesophyll-Protoplasten exprimiert und mit Flg22 behandelt.

Abb. 3.20 zeigt die Aktivierung der unterschiedlichen Konstrukte nach Induktion mit 200 nM Flg22. Beim WT-Protein war die Veränderung des Bandenmusters nach der Flg22-Behandlung gut zu erkennen, wohingegen das Bandenmuster der Kinase-inaktive Form keine Veränderung aufwies. Auch die T98A/S100A-Variante des Proteins zeigte die vom WT-Protein bekannte Veränderung des Bandenmusters. Im Gegensatz dazu war für die S8A-Variante keine Induktion durch Flg22 zu verzeichnen und die S8D-Variante wies mit und ohne Stressstimulus ein im Vergleich zum WT verändertes Bandenmuster auf. Hier war auch ohne Flg22-Stimulus keine nicht-phosphorylierte Bande mehr zu



erkennen. Stattdessen ist neben der oben laufenden phosphorylierten Bande eine zusätzliche Bande zu sehen, die in keiner anderen Probe zu beobachten war.

Abbildung 3.20 Untersuchung zur Auswirkung von Autophosphorylierungsstellen *in vi-vo*: *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten wurden mit *At*CPK5 WT; der Kinase-inaktiven Form (-mut) und den Phosphorylierungsmutanten S8A, S8D und T98A/S100A transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 200 nM Flg22 behandelt. Die auf Nitrocellulose immobilisierten StrepII-markierten Proteine wurden mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin nachgewiesen.

Neben der Charakterisierung der *in vitro* identifizierten Phosphorylierungsstellen von Hegeman et al. sollten auch Flg22-abhängige *in vivo*-Phosphorylierungen identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden *At*CPK5 und die inaktive Kinase in Mesophyll-Protoplasten exprimiert, 10 min mit 200 nM Flg22 behandelt und nach der Reinigung des Proteins mittels Strep-Tactin und SDS-PAGE mit Trypsin verdaut. Die so erhaltenen Peptide wurden anschließend in der AG Schulze (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) mit LC-MS/MS-Analysen auf Phosphorylierungen untersucht.

In Tabelle 3.1 sind die für *At*CPK5 und *At*CPK5-mut identifizierten *in vivo*-Phosphorylierungsstellen aufgelistet. Mögliche, aber nicht eindeutig identifizierte Phosphorylierungen sind durch klein geschriebene und eingeklammerte Buchstaben markiert. Eindeutig identifizierte Phosphorylierungen sind durch (pS) kenntlich gemacht.

| Protein | Peptidsequenz                  | Anzahl (-P) | Position     |
|---------|--------------------------------|-------------|--------------|
| AtCPK5  | TSTTNLS(s)N(s)DHSPNAADIIAQEFSK | 1           | \$34/\$36    |
|         | N(pS)LNI(pS)MR                 | 2           | \$548; \$552 |
| AtCPK5- | TSTTNLS(s)N(s)DHSPNAADIIAQEFSK | 1           | S34/S36      |
| mut     | N(pS)LNISMR                    | 1           | S548         |

Tabelle 3.1 Identifizierte Phosphorylierungen von AtCPK5 nach Flg22-Behandlung

Sowohl bei der aktiven, als auch in der inaktiven Kinase wurden zweimal die gleichen Phosphopeptide gefunden. Allerdings wurden in einem Peptid (NSLNISMR) der aktiven Kinase zwei Phosphorylierungen nachgewiesen. Im Kinase-inaktiven Protein wurde nur ein Serin dieses Peptides phosphoryliert. Die von Hegeman et al. identifizierten Phosphorylierungsstellen konnten in dieser Analyse nicht identifiziert werden.

# 3.5 Patho-physiologische Untersuchungen der *Atcpk6*-Mutante

### 3.5.1 Infektion mit Pseudomonas syringae pv. tomato

Da für die *At*CPK5 keine *knock-out*-Mutanten vorlagen, wurden die phänotypischen Analysen nur mit der *Atcpk6*-Mutante SALK\_025460 durchgeführt.

Eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen äußert sich bei Pflanzen durch das verstärkte oder verfrühte Auftreten von Krankheitssymptomen wie Chlorosen und Nekrosen. Aus diesem Grund wurden die *Atcpk6*-Mutanten zunächst einer phänotypischen Analyse nach Pathogeninfektion im Vergleich zum Col-0 WT unterzogen.

Abb. 3.21 zeigt Blätter von fünf Wochen alten Col-0 WT-Pflanzen und der *Atcpk6*-Mutante vier Tage nach Infiltration mit dem virulenten *Pseudomonas* Stamm DC3000. In beiden Linien sind die typischen, durch das Bakterium hervorgerufenen Chlorosen zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied in der Stärke und Ausprägung dieser Chlorosen konnte nicht beobachtet werden.



Abbildung 3.21 Phänotypischer Vergleich der *Atcpk6* Mutante mit dem Col-0 WT nach Infektion mit *Pst* DC3000: Die Blätter von 5 Wochen alten unter Kurztagbedingungen kultivierten Pflanzen wurden mit 10<sup>6</sup> cfu/ml Bakterien infiltriert. Die Symptome wurden 4 Tage nach Infektion dokumentiert.

Ein weiterer Indikator für die Resistenz von Pflanzen gegenüber bakteriellen Infektionen ist, neben den sichtbaren Symptomen, das Bakterienwachstum in den Interzellularräumen der Blätter nach einer Infektion. Zur Untersuchung des Bakterienwachstums können die Bakterien entweder mit einer Spritze direkt in die Interzellularen der Blätter injiziert werden oder aber die Pflanzen werden mit einer Bakteriensuspension besprüht und die Bakterien gelangen über die Stomata in das Blattinnere.

Da zum Beispiel von der *fls2*-Mutante bekannt ist, dass sie nur nach besprühen, aber nicht nach Infiltration, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* aufweist (Zipfel et al., 2004), wurden die *Atcpk6*-Mutanten sowohl durch Infiltration (Abb. 3.22 A) als auch durch Besprühen (Abb. 3.22 B) infiziert.



Abbildung 3.22 Bakterienwachstum von *Pst* DC3000, AvrRpm1 und hrcC<sup>-</sup> in *Atcpk6*-Mutanten im Vergleich zum Col-0 WT: Die Pflanzen wurden mit der entsprechenden Bakteriensuspension (10<sup>4</sup> cfu/ml bei Infiltration und 10<sup>8</sup> cfu/ml beim Besprühen) inokuliert. Direkt nach der Inokulation bzw. nach 1 bzw. 3 Tagen, wurden die Blätter geerntet, die Bakterien aus den Blättern in Suspension gebracht und in Verdünnungsreihen auf LB-Agar-Platten ausplattiert. A) zeigt das Bakterienwachstum nach Infiltration und B) das Wachstum der Bakterien in den besprühten Pflanzen. Die Graphen zeigen den Mittelwert und  $\pm n \ge$ 6. Die gezeigte Abbildung ist Repräsentativ für A) 3 und B) 2 unabhängige Experimente.

In beiden Fällen ist deutlich zu erkennen, dass der pathogene Bakterienstamm DC3000 in der Lage war, sich in den Pflanzen zu vermehren. Im Gegensatz dazu zeigten der avirulente Stamm AvrRpm1 und der apathogene Stamm hrcC<sup>-</sup> nur eine sehr begrenzte (Abb. 3.22 A) bzw. gar keine Vermehrung (Abb. 3.22 B). In allen Fällen war jedoch keine signifikante Veränderung des Bakterienwachstums zwischen Col-0 WT und der *Atcpk6*-Mutante zu sehen.

### 3.5.2 Infektion mit Alternaria brassicicola

Neben dem hemibiotrophen bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* wurde auch der nekrotrophe Pilz *Alternaria brassicicola* für Infektionsversuche verwendet. Blätter des Col-0 WT und der *Atcpk6*-Mutante wurden mit einer Sporensuspension des Pilzes betropft und nach einigen Tagen auf die Bildung von Chlorosen sowie Nekrosen untersucht.

Fünf Tage nach der Infektion waren bei beiden Linien an den Applikationsstellen dunkel verfärbte Bereiche zu erkennen. Bei vielen Blättern hatten sich um diese dunklen nekrotischen Stellen zusätzlich gelbe chlorotische Bereiche ausgebildet. Aber auch hier war wiederum kein signifikanter Unterschied in der Ausbildung der Krankheitssymptome zwischen dem Col-0 WT und der Mutante auszumachen.



Col-0 WT

Atcpk6

Abbildung 3.23 Phänotypischer Vergleich der *Atcpk6*-Mutante mit dem Col-0 WT nach Infektion mit *Alternaria brassicicola*: Blätter von fünf Wochen unter Kurztagbedingungen kultivierten Col-0 WT und *Atcpk6*-Pflanzen wurden durch das Auftropfen von 6-8 Tropfen mit 5\*10<sup>5</sup> Sporen/ml infiziert. Fünf Tage nach der Infektion wurden die infizierten Blätter abgeschnitten und dokumentiert.

## 3.5.3 Untersuchung der Calciumströme nach Flg22-Behandlung in *Atcpk6*-KO-Pflanzen

Für *At*CPK1 konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, die Calciumpumpe *At*ACA2 zu phosphorylieren und somit zu inhibieren (Hwang et al., 2000). Dies lässt den Rück-

schluss zu, dass CDPKs nicht nur durch Calcium aktiviert werden, sondern, dass CDPKs auch direkt an der Regulation der cytoplasmatischen Calciumkonzentration beteiligt sein könnten.

Um zu testen, ob *At*CPK6 einen Einfluss auf die cytoplasmatische Calciumkonzentration nach Flg22-Behandlung hat, wurden *Atcpk6*-KO-Pflanzen mit Pflanzen gekreuzt, die das Calcium-bindende Photoprotein Aequorin aus *Aequorea victoria* unter der Kontrolle des 35S-Promoters exprimieren. Zusammen mit dem Ko-Faktor Coelenterazin, einem Luciferin, emmitiert Aequorin nach Calciumbindung Licht, welches mit einem Luminometer gemessen werden und aus dessen Intensität die Calciumkonzentration errechnet werden kann (Knight et al., 1991; Rentel und Knight, 2004). Die Messungen der cytosolischen Calciumkonzentrationen nach Flg22-Behandlung wurden am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle durchgeführt.

Abb. 3.24 zeigt die Ergebnisse der Messung der cytosolischen Calciumkonzentration von sieben Tage alten Keimlingen aus drei unabhängigen Kreuzungen, die mit 1 $\mu$ M Flg22 behandelt wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Calciummuster zwischen den *Atcpk6*/Aequorin Linien #1, #6 und #21 und den Aequorin exprimierenden WT-Pflanzen. In allen Fällen war ein Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration innerhalb der ersten Minute zu erkennen und auch der Abfall der Calciumkonzentration in den Zellen war in allen Linien vergleichbar.



Abbildung 3.24 Messung der cytosolischen Calciumkonzentration in *Atcpk6*-KO-Pflanzen nach Flg22-Behandlung: Sieben Tage alte Keimlinge wurden mit 1  $\mu$ M Flg22 behandelt. Die Calciumkonzentration wurde aus der relativen Aequorin-Lumineszenz errechnet. Die Werte zeigen den Mittelwert und  $\pm$  SD aus n  $\geq 10$ 

# 3.6 Phänotyische Analyse 35S: AtCPK5-YFP exprimierender Pflanzen

Für die subzelluläre Proteinlokalisation (Kap. 3.3) wurden transgene Pflanzen generiert, die ein Fusionskonstrukt von *AtCPK5* und dem *YFP*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promoters exprimieren. Diese transgenen Pflanzen zeigten im Vergleich zum WT allerdings makroskopische Veränderungen. Das Wachstum der *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen war besonders in der Linie #2, und in geringerem Maße in der Linie #7, reduziert (Abb. 3.26 A, 3.27 A, 3.28 A) und die Blätter wiesen chlorotische und nekrotische Bereiche an den Blatträndern auf, die mit steigendem Alter stärker wurden (Abb. 3.25).



Abbildung 3.25 Phänotyp 35S:*At*CPK5-YFP exprimierender Pflanzen: Vergleich von unbehandelten Blättern vom Col-0 WT und 35S:*At*CPK5-YFP exprimierender Pflanzen. Die Pfeile markieren die chlorotischen und später nekrotischen Bereiche an den Blatträndern der transgenen Pflanzen.

### 3.6.1 Markergenanalysen 35S: AtCPK5-YFP exprimierender Pflanzen

Aufgrund des beobachteten Phänotyps wurden diese Pflanzen einer genaueren Analyse unterzogen. Zuerst wurde mittels RT-PCR die Expression von verschiedenen pathogeninduzierten Markergenen in unbehandelten Pflanzen analysiert (Abb. 3.26). Bei den zwei untersuchten AtCPK5-YFP exprimierenden Linien #2 und #7 wurde in allen Pflanzen ein AtCPK5-YFP spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen. Die Stärke des Phänotyps korrelierte jedoch nicht mit der Stärke der Expression des YFP-Konstruktes und auch die Expression der endogenen AtCPK5 wurde durch das Transgen nicht verändert. Im Vergleich zum WT konnte sowohl für FRK1 als auch für die Phytohormon-Markergene PR1, ICS1 (Salicylsäure) und PR4 (Ethylen), eine zum Teil stark erhöhte Expression der Jasmonsäure-Markergene LOX3 und VSP2 nahezu unverändert.



Abbildung 3.26 Phänotyp und RT-PCR-Analyse von *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen: A) zeigt die für die RT-PCR-Analyse verwendeten drei Wochen unter Kurztagbedingungen kultivierten Pflanzen. Je sechs Pflanzen der *At*CPK5-YFP exprimierenden Linien wurden entsprechend der Wachstumsverzögerung angeordnet. 1 = sehr starke Ausprägung bis 6 = geringste Ausprägung. B) RT-PCR-Analyse der in A) gezeigten Pflanzen. Das komplette grüne Gewebe wurde in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und mit einer Schwing-Mühle zerkleinert. Die RNA wurde mittels TRIsure (Bioline) extrahiert und mit M-MLV reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Es folgten die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Markergene. Alle in A) gezeigten Bilder wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen.

#### 3.6.2 Proteinexpression

Um zu testen, ob nicht nur die transgene mRNA sondern auch das *At*CPK5-YFP-Fusionsprotein nachzuweisen ist, wurden ein Gesamt-Proteinextrakt aus zwei Col-0 WT bzw. je drei Pflanzen der *At*CPK5-YFP exprimierenden Linien #2 und #7 (Abb. 3.27 A) hergestellt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Immobilisierung der Proteine auf Nitrocellulose wurden die mit YFP fusionierten Proteine mit einem YFP-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.27 B).



Abbildung 3.27 YFP-spezifischer Proteinnachweis der AtCPK5-YFP exprimierenden Pflanzen: A) zeigt die für den Proteinnachweis verwendeten vier Wochen alten, unter Kurztagbedingungen kultivierten Pflanzen. B) Western Blot mit YFP-spezifischem Antikörper nach SDS-PAGE und Immobilisierung der Proteine auf Nitrocellulose. Das YFP-markierte Protein ist im oberen Teil gezeigt. Im unteren Teil ist die Ponceau-S gefärbte RuBisCo als Ladungskontrolle dargestellt. Alle in A) gezeigten Bilder wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen

Bei allen Pflanzen der Linien #2 und #7 konnte das Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 3.27) und auch hier war die schon aus den transienten Expressionen bekannte Doppelbande für *At*CPK5 zu beobachten. Aber auch hier konnte, wie bei der Expressionsanalyse, keine Korrelation zwischen Phänotyp und Expressionsstärke nachgewiesen werden.

### 3.6.3 Infektion mit Pseudomonas syringae pv. tomato

Aufgrund der beobachteten erhöhten Expression von pathogen-induzierten Markergenen (Abb. 3.26) wurde die Anfälligkeit der *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen gegenüber *Pst* DC3000 getestet. Zu diesem Zweck wurden Col-0 WT und *At*CPK5-YFP #7 Pflanzen mit 2\*10<sup>8</sup> cfu/ml *Pst* DC3000 und *Pst* hrcC<sup>-</sup> besprüht und die Entwicklung der Symptome beobachtet (Abb. 3.28).



Abbildung 3.28 Phänotypischer Vergleich der AtCPK5-YFP exprimierenden Pflanzen mit Col-0 WT nach Infektion mit Pst DC3000 und hrcC<sup>-</sup>: Col-0 WT und AtCPK5-YFP exprimierenden Pflanzen wurden mit 2\*10<sup>8</sup> cfu/ml Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 bzw. hrcC<sup>-</sup> besprüht. Fünf Tage nach Infektion wurde die Ausbildung der Symptome dokumentiert.

Auffällig ist das verstärkte Auftreten von chlorotischen Bereichen bei den *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen, die mit dem apathogenen Stamm hrcC<sup>-</sup> besprüht wurden. Die Col-0 WT-Pflanzen zeigten dagegen keine äußerlich sichtbare Reaktion auf diesen Bakterienstamm.

Im Gegensatz dazu zeigten die Col-0 WT-Pflanzen, die mit dem pathogenen Bakterienstamm DC3000 besprüht wurden, fünf Tage nach Infektion eine stärke Bildung von Chlorosen als die *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen.

# 4 Diskussion

Pflanzen sind in freier Natur ständig von potentiellen Pathogenen umgeben. Im Laufe der Evolution haben sie ein effektives Abwehrsystem gegen phytopathogene Organismen entwickelt, das erstaunliche Parallelen zum tierischen Immunsystem aufweist (Nürnberger und Kemmerling, 2006; Zipfel, 2008). Neben der Erkennung einer Infektion durch extra- und intrazelluläre Rezeptoren, ist auch die intrazelluläre Signaltransduktion eine sehr wichtige Komponente bei der erfolgreichen Pathogenabwehr. Calcium spielt hierbei eine wichtige, aber noch wenig verstandene Rolle (Aslam et al., 2008; Lecourieux et al., 2006). Insbesondere die Komponenten der Signalkaskaden, welche die pathogenspezifischen Calciumsignale perzipieren, sind bislang unbekannt.

Eine der größten Gruppe von Calcium-perzipierenden Proteinen in Pflanzen sind die Calcium-abhängigen Protein-Kinasen (CDPK). Sie werden, neben dem CBL-CIPK Netzwerk, als wichtigste Komponenten in der Calcium-abhängigen Signaltransduktion diskutiert (Harper und Harmon, 2005). Für CDPK2 und CDPK3 aus *Nicotiana tabacum* konnte bereits eine Funktion bei der R-Gen-vermittelten Pathogenabwehr nachgewiesen werden (Romeis et al., 2000; Romeis et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von konstitutiv aktiven Varianten von *Hv*CDPK3 und *Hv*CDPK4 an der Ausprägung der Resistenz gegenüber dem biotrophen Pilz *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* beteiligt sind (Freymark et al., 2007). Darüber hinaus führt die Expression der konstitutiv aktiven Varianten von *Nt*CDPK2 und *Hv*CDPK4 in *N. benthamiana*-Blättern zu einem Kinase-abhängigen Zelltod (Romeis et al., 2001; Freymark et al., 2007).

In Voruntersuchungen zu dieser Arbeit wurde dieser Effekt genutzt, um CDPKs aus *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, die potentiell an der Pathogen-induzierten, Calcium-abhängigen Signaltransduktion beteiligt sind. Insgesamt wurden 12 CPKs aus allen vier Unterfamilien getestet. Nur bei drei der getesteten *Arabidopsis*-CPKs führte die Expression zu vergleichbaren Zelltodereignissen wie nach Expression der *Nt*CDPK2. Bei diesen Kinasen handelte es sich um *At*CPK1 und um die in dieser Arbeit untersuchten *At*CPK5 und *At*CPK6 (Komander und Romeis, unveröffentlicht).

## 4.1 Expression und Lokalisierung von AtCPK5 und AtCPK6

### 4.1.1 Gewebespezifische Expression

Für die Analyse der gewebespezifischen Expression der in dieser Arbeit untersuchten Kinasen *At*CPK5 und *At*CPK6, wurden einerseits *Microarray*-Analysen aus der *Genevestigator*-Datenbank herangezogen (Abb. 3.2), als auch transgene *Arabidopsis*-Pflanzen genutzt, die das Reportergen beta-Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle des jeweiligen CPK-Promoters exprimierten (Abb. 3.3, 3.4).

Im Falle der *AtCPK5*-Expression sind die Ergebnisse beider Analysen vergleichbar. Das Gen wird über den gesamten Entwicklungszeitraum und in nahezu allen Organen exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich der *Microarray*-Daten und der GUS-Färbung für die Expression der *AtCPK6* deutliche Differenzen. Laut den *Microarray*-Daten wird *AtCPK6* sehr stark während der Keimung in den Kotyledonen und dem Hypocotyl exprimiert. Demgegenüber stehen die Daten der GUS-gefärbten Pflanzen: In 4 Tage alten Keimlingen ist hier nur eine GUS-Expression in der Wurzel, aber nicht in den oberirdischen Pflanzenteilen, zu erkennen (Abb. 3.4 A). Die Expression bleibt auch während der weiteren Entwicklung im wesentlichen auf die Wurzeln beschränkt, auch wenn mit fortschreitendem Alter eine GUS-Expression in den Leitgeweben und Hydathoden der Blätter zu erkennen ist (Abb. 3.4 B-H).

Diese Diskrepanz zwischen den *Microarray*-Daten und der GUS-Färbung liegt sehr wahrscheinlich an der Art der Datenverarbeitung bei der Darstellung der *Microarray*-Daten. Die Metaanalysen des *Genevestigator*-Projektes verwenden für diese Darstellung nicht nur Daten aus Experimenten, welche die Untersuchung der gewebespezifischen Expression zum Ziel haben, sondern auch Daten aus Stressexperimenten. Zudem kann es bei sehr schwachen Expressionen in einzelnen Geweben, wie es für die *AtCPK6* in grünem Gewebe der Fall ist, zu sehr großen Schwankungen kommen, die die Daten in einer Metaanalyse verfälschen können.

Übereinstimmend mit Mori et al. (2006) und Yang et al. (2008) konnte auch in dieser Arbeit eine Expression von *AtCPK5* und *AtCPK6* in Schließzellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die sehr starken Unterschiede in den Expressionsmustern der in dieser Arbeit untersuchten Gene und die sehr große Homologie dieser Genprodukte zueinander lassen vermuten, dass beide Proteine ähnliche Funktionen in der Pathogenabwehr ausüben, aber hauptsächlich in unterschiedlichen Geweben. Denn Pflanzen sind nicht nur überirdisch lebenden Pathogenen ausgesetzt. Auch in der Erde lebt eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Nematoden, die pflanzliches Gewebe als Nahrung nutzen. Daher besitzen Pflanzen auch in der Wurzel sowohl die nötigen Rezeptoren für die Erkennung der Pathogene als auch die entsprechenden Signaltransduktionskomponenten um einen Pathogenbefall abwehren zu können. Der Flagellin-Rezeptor FLS2 wird Beispielsweise in nahezu allen Pflanzenteilen, auch in der Wurzel, exprimiert (Robatzek et al., 2006).

Gomez-Gomez et al. konnten 1999 zeigen, dass hohe Konzentrationen von Flg22 das Wachstum von Col-0 WT-Pflanzen in Flüssigkultur stark hemmen. Erste vorläufige Untersuchungen an *Atcpk6*-Mutanten zeigten jedoch keinen Unterschied im Wachstum im Vergleich zum WT in Anwesenheit von Flg22. Erst die Doppelmutation von *Atcpk6* mit den für die Pathogenabwehr wichtigen MAP-Kinasen *Atmpk3* bzw. *Atmpk6* zeigten schwache veränderte Flg22-abhängige wachstumsinhibitorische Effekte (Dubiella und Romeis, unveröffentlicht). Dies könnte bedeuten, dass *At*CPK6 und eventuell auch *At*CPK5 die von Asai et al. (2002) diskutierte, parallel zu den MAP-Kinasen verlaufende, Calcium-abhängige Signalkomponente darstellen.

Weiterhin ist interessant zu untersuchen, in wie weit sich *At*CPK5 und *At*CPK6 überexprimierende Pflanzen in diesem Test verhalten. Auch die Kreuzungen der CPK überexprimierenden Pflanzen mit den *Atmpk3*- und *Atmpk6*-Mutanten sollten in diesen Test mit einbezogen werden.

#### 4.1.2 Subzelluläre Lokalisierung

Beide in dieser Arbeit untersuchten Kinasen zeigen eine ähnliche subzelluläre Lokalisation (Abb. 3.7, Abb. 3.8). Nach Plasmolyse von Epidermiszellen sind für beide Kinasen Hecht'sche-Fäden sichtbar, die für eine Plasmamembranlokalisierung sprechen. Ein gewisser Anteil des Proteins ist aber in beiden Fällen auch im Cytoplasma zu finden. Dies zeigt sich dadurch, dass in den Protoplasten neben der Plasmamembran auch die Bereiche um die Chloroplasten ein YFP-Signal aufweisen (Abb. 3.7 A, Abb. 3.8 A). Die cytoplasmatische Lokalisierung von *At*CPK6-YFP zeigt sich auch nach transienter Expression in *N. benthamiana* (Abb. 3.8 B). Hier kann man neben den Cytoplasmasträngen auch ein starkes YFP-Signal am Zellkern erkennen.

Diese Daten für *At*CPK6 decken sich mit denen von Benetka et al. (Benetka et al., 2008). Neben drei weiteren CDPKs aus *Arabidopsis* untersuchten sie auch die subzelluläre Lokalisation der *At*CPK6 mit YFP-Fusionsproteinen nach transienter Expression in *Arabidopsis*-Protoplasten und Blättern von *N. benthamiana*. Auch in dieser Untersuchung wurde eine Plasmamembranlokalisierung für *At*CPK6-YFP sowohl in den Protoplasten als auch in *N. benthamiana* Epidermiszellen nachgewiesen. Weiterhin konnten Benetka et al. auch eine kernassoziierte Lokalisierung für *At*CPK6-YFP nach Expression in *N. benthamiana*-Blättern zeigen, die in den *Arabidopsis*-Protoplasten nicht zu erkennen war.

Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Expression der YFP-Fusionsproteine sowohl in dieser Arbeit, als auch in der Untersuchung von Benetka et al., durch den sehr starken und konstitutiv aktiven Promoter 35S des Blumenkohl-Mosaik-Virus gesteuert wurde. Hinzu kommt, dass die Lokalisierung der Proteine in *Arabidopsis*-Protoplasten und *N. benthamiana*-Blättern zu unterschiedlichen Zeitpunkten betrachtet wurde. Bei der Expression in Protoplasten wurden die Zellen spätestens einen Tag nach der Transfektion untersucht. Die Lokalisierung in den *N. benthamiana*-Blättern erfolgte jedoch 2-3 Tage nach Infiltration der Agrobakterien. Dies könnte dazu führen, dass in den *N. benthamia-na*-Blättern über die Zeit zu viel Protein exprimiert wurde, um eine korrekte Lokalisation zu ermöglichen. Es ist daher gut möglich, dass die in den *N. benthamiana*-Blättern zu erkennende kernassoziierte Lokalisierung ein Artefakt darstellt.

Ein Proteinabbau nach Flg22-Stimulus, wie er von FLS2 bekannt ist (Robatzek et al., 2006), konnte weder für *At*CPK5-YFP noch für *At*CPK6-YFP beobachtet werden. Darüber hinaus war auch keine Relokalisierung der beiden Proteine nach Behandlung mit Flg22 zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Doch auch hier ist es denkbar, dass die sehr starke Expression auf Grund des 35S-Promoters eine Veränderung der Proteinlokalisierung oder Menge verdeckt. Die Expression der YFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle der nativen Promotoren könnte eventuell doch vorhandene Veränderungen sichtbar machen.

#### 4.1.3 Pathogen-induzierte Expression

Viele an der Pathogenabwehr beteiligten Gene zeigen eine nach Pathogenbefall erhöhte Expression (Navarro et al., 2004). Dies wird als positive Rückkopplung diskutiert, die dazu beitragen soll, die Anwesenheit von Pathogenen effektiver wahrzunehmen und die Signale schneller weiterleiten zu können (Zipfel et al., 2004; Sanabria et al., 2008). Die Expressionsanalysen dieser Arbeit, bezüglich der Expression von *AtCPK5* und *AtCPK6* zeigen ein uneinheitliches Bild (Abb. 3.5, Abb. 3.6). Beide Gene zeigen keine signifikante Induktion der Genexpression nach Infiltration des virulenten Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 bzw. des apathogenen Stamms *Pst* hrcC<sup>-</sup> über einen Zeitraum von insgesamt 30h nach Infektion (Abb. 3.5). Hierbei handelte es sich jedoch lediglich um semi-quantitative RT-PCRs mit denen nur geringe Änderungen des Expression nicht nachgewiesen werden können. Für eine genauere Analyse bieten sich

quantitative Real-Time PCR-Analysen an, da diese wesentlich sensitiver sind.

Nach Auswertung der Genevestigator-Daten zeigt sich für AtCPK5 auch nach Behandlung mit den allgemeinen Elizitoren Flg22, HrpZ, LPS und NPP1 ebenfalls keine Veränderung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu ist für AtCPK6, 4h nach Infiltration von Flg22 und HrpZ, eine ca. zwei bis dreifache Induktion der Genexpression zu beobachten (Abb. 3.6). Hierbei ist allerdings anzumerken, dass bei Microarray-Experimenten eine zweifache Induktion der Expression die unterste Grenze darstellt, ab der man eine Induktion als signifikant bezeichnen kann. Insofern muss, auch bei Berücksichtigung der Standardabweichung, diese Induktion der Genexpression von AtCPK6 durch Flg22 und HrpZ vorsichtig bewertet werden. Zudem wurde in gewisser Weise die Flg22-Elizitierung mit dem Bakterienstamm Pst hrcC<sup>-</sup> im RT-PCR-Experiment nachgestellt. Diese Bakterien sind nicht mehr in der Lage, ein funktionsfähiges Typ-III-Sekretionssystem auszubilden, so dass hier kein Transfer von Effektor-Proteinen möglich ist, die eine Abwehrreaktion unterdrücken könnten (Kloek et al., 2000). Dennoch besitzen diese Bakterien immer noch ein Flagellum mit dem Flg22-Peptid, das von FLS2 erkannt wird und eine Induktion der Expression im RT-PCR Experiment hätte auslösen können.

Der virulente Bakterienstamm DC3000 kann mit seinem funktionsfähigem Typ-III-Sekretionssystem den HrpZ-Elizitor sekretieren, doch ist auch hier keine signifikante Induktion der Expression im RT-PCR-Experiment zu erkennen (Abb. 3.5). In diesem Fall könnten allerdings andere bakterielle Effektoren einer potentiellen Änderung der Transkriptmenge entgegen wirken.

Eine Induktion der *AtCPK5*- und *AtCPK6*-Expression ist aber auch nicht zwingend zu erwarten. Das Flg22-spezifische Calciumsignal erreicht sein Maximum schon nach fünf Minuten und fällt dann innerhalb der nächsten zehn Minuten wieder auf sein Basalwert zurück (Abb. 3.24). Aufgrund dieser kurzen Zeitspanne müssen die primären Calciumsensoren schon von vornherein vorhanden sein. Darüber hinaus konnte kein Proteinabbau der untersuchten CPKs nach Elizitierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), wie dies zum Beispiel bei FLS2 nach Flg22-Bindung der Fall ist (Robatzek et al., 2006), und eine Neusynthese des Proteins nötig macht.

# 4.2 Patho-physiologische Untersuchungen der *Atcpk6*-Mutanten

Obwohl für *AtCPK6* keine starke Expression in den überirdischen Geweben nachzuweisen war (Abb. 3.4), war es dennoch sinnvoll patho-physiologische Untersuchungen an *Atcpk6*-Mutanten durchzuführen. Mori et al. konnten 2006 zeigen, dass die Abscisinsäure- (ABA) und Calcium-abhängige Schließung der Stomata in einer *Atcpk6/Atcpk3*-Doppelmutante beeinträchtigt war. Das Phytohormon ABA wurde bis vor kurzem hauptsächlich mit der Regulation von abiotischen Stressantworten in Verbindung gebracht (Christmann et al., 2006; Song et al., 2008). Neuere Untersuchungen legen aber nahe, dass ABA neben der Regulation von abiotischen Stressantworten, auch an der Steuerung von Pathogen-induzierten Prozessen beteiligt ist (Mauch-Mani und Mauch, 2005; Asselbergh et al., 2008; Ton et al., 2009). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Pflanzen die Stomata aktiv schließen, nachdem sie eine Infektion erkannt haben und dass diese Reaktion sowohl ABA- als auch Salicylsäure (SA)-abhängig ist (Melotto et al., 2008).

Die T-DNA-Insertion innerhalb von *AtCPK6* hatte jedoch weder einen Einfluss auf das Krankheitsbild und das Wachstum von *Pseudomonas syringae* Bakterien (Abb. 3.21, Abb. 3.22) noch auf das Wachstum des nekrotrophen Pilzes *Alternaria brassicicola* (Abb. 3.23).

Für die Analyse der Flg22-abhängigen Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration wurden *Atcpk6*-Mutanten mit Pflanzen gekreuzt, die das Calcium-sensitive Photoprotein Aequorin unter der Kontrolle des 35S-Promoters exprimieren. Diese Experimente zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied der cytosolischen Calciumkonzentrationen zwischen der Mutante und dem Col-0 WT (Abb. 3.24).

Vor dem Hintergrund der Redundanz von Proteinen innerhalb einer großen Proteinfamilie und in Anbetracht der Resultate von Mori et al. (2006) ist es sicherlich angebracht, auch die *Atcpk3/Atcpk6*-Doppelmutante patho-physiologischen Tests zu unterziehen. Darüber hinaus könnten auch *At*CPK6 Überexpressionslinien hilfreich sein, eine mögliche *in vivo*-Funktion dieser Kinase bei der Pathogenabwehr zu beschreiben. Zur Zeit werden diese Überexpressionslinien auf die Expression des Transgens getestet und selektiert.

Neben der *Atcpk6*-Mutante wäre es wünschenswert gewesen auch eine *Atcpk5*-Mutante patho-physiologisch testen zu können. Allerdings sind weder bei T-DNA Express (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress), noch über das GABI-KAT Projekt (Li et al., 2007) T-DNA-Insertionslinien für *AtCPK5* in den Datenbanken zu finden. Die anschließende Suche nach potentiellen Stopp-Codon Mutationen der im Rahmen des Tilling-Projektes identifizierten *Atcpk5*-Mutationen war für eine Linie erfolgreich. Bislang ist es jedoch nicht gelungen eine homozygote *Atcpk5*-Pflanze dieser Linie zu selektieren.

### 4.3 Biochemische Aktivierung nach Elizitierung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht die biochemische Charakterisierung mit transient in *N. benthamiana* exprimiertem Protein durchzuführen. Nach gelelekrophoretischer Auftrennung der Kinase-aktiven CPK5 war in allen Proben eine Doppelbande zu beobachten, doch es gab keine Veränderung des Bandenmusters nach Elizitierung mit Flg22 (Abb. 3.9 A, Abb. 3.10). Des Weiteren konnte keine Induktion der Aktivität nachgewiesen werden, da die Proteine auch ohne Elizitierung eine sehr starke Aktivität aufwiesen (Abb. 3.9 B, Abb. 3.10).

Der Grund für diese Beobachtungen könnte an der Methode der Proteinexpression selbst liegen. Für die transiente Expression in *N. benthamiana* werden die Blätter mit Agrobakterien infiltriert, die das zu exprimierende Transgen in die Blattzellen einschleusen. Diese Bakterien verbleiben bis zur Ernte und Proteinreinigung in den Blättern und besitzen natürlich auch diverse PAMPs, die zu Abwehrreaktionen führen können. Daher war es für die Aktivierung der *At*CPK5 irrelevant, ob nachträglich noch eine Elizitierung erfolgte oder nicht.

Aus diesem Grund wurde das transiente Expressionssystem in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten (Yoo et al., 2007) im Labor etabliert. Bei diesem System wird die zu exprimierende DNA direkt in die Mesophyll-Zellen transfiziert und somit die Nutzung von Bakterien umgangen. Darüber hinaus kann es auch von Vorteil sein, dass es sich bei der hier durchgeführten Untersuchung der *Arabidopsis*-Proteine *At*CPK5 bzw. *At*CPK6 um ein homologes Expressionssystem handelt, im Gegensatz zum heterologen System der Expression in *N. benthamiana*.

Bei der transienten Expression in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten ist es wichtig, eine möglichst große Transfektionseffizienz zu erreichen, nicht nur um möglichst große Proteinmengen zu erhalten, sondern auch, um eventuell auftretende Effekte, die durch das Transgen verursacht werden, detektieren zu können. Im Laufe dieser Arbeit wurden nach einigen Etablierungsversuchen und Anpassungen routinemäßig hohe Transfektionsraten von 70-80% erzielt (Abb. 3.11), was eine ausreichend hohe Transfektionsrate darstellt.

Nach Expression von *At*CPK5 und *At*CPK6 und Behandlung mit Flg22 zeigte sich eine Veränderung des Laufverhaltens im SDS-Gel von *At*CPK5 im Vergleich zur nicht behandelten Probe. Im Fall der *At*CPK6 war nur eine sehr schwache und für *At*CPK21 war keine Änderung zu den nicht behandelten Proben zu erkennen (Abb. 3.12). Für andere Kinasen und auch für die *Nt*CDPK2 ist dieser Effekt bereits beschrieben worden und wird durch Phosphorylierungen verursacht (Romeis et al., 2000; Peck, 2006). Da Phosphorylierungen nicht die nötige Masse haben, um eine solche Verschiebung des Proteins um mehrere Kilodalton zu verursachen, wird angenommen, dass eine Phosphorylierung, abhängig von der Ladung der umliegenden Aminosäuren, die SDS-Hülle, welche die Proteine bei der SDS-PAGE einschließt, derart verändert, dass sie langsamer durch das Gel laufen (Peck, 2006). Darüber hinaus können auch andere post-translationale Modifikationen zu einem veränderten Laufverhalten führen (Peck, 2006).

Um nachzuweisen, dass es sich bei der für die *At*CPK5 beobachteten Modifikation um Phosphorylierungen handelt, wurde das Protein in Mesophyll-Protoplasten exprimiert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und *in-vitro* mit einer Phosphatase inkubiert (Abb. 3.13). Nur in den Proben in denen keine Phosphatase eingesetzt wurde, kann die Doppelbande erkannt werden. Weiterhin ist auffällig, dass diese Verschiebung der Banden nur beim Kinase-aktiven Protein zu sehen ist und nicht bei der Kinase-inaktiven Mutante. Dies lässt auf eine oder mehrere Autophosphorylierungen schließen (siehe auch Abschnitt 4.4).

Obwohl für *At*CPK6 nur eine sehr schwache Veränderung des Laufverhaltens beobachtet werden konnte, kann hier eine Phosphorylierung nicht ausgeschlossen werden, denn viele Phosphorylierungen manifestieren sich nicht unbedingt in der oben beschriebenen Weise (Peck, 2006).

Da Calcium ein wichtiger sekundärer Botenstoff in einer Vielzahl von verschiedenen Reaktionen ist, musste ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Aktivierung der *At*CPK5 nach der Behandlung mit Flg22 um einen methodisch bedingten Nebeneffekt handelt. Zu diesem Zweck wurden, parallel zu den Col-0 WT-Protoplasten, auch Zellen von *fls2-* und *bak1-3-*Mutanten transfiziert und mit Flg22 behandelt (Abb. 3.16). In den *fls2-*Mutanten war keine Aktivierung der Kinase nach Flg22-Applikation zu erkennen. Dies zeigt, dass die Aktivierung der *At*CPK5 Flg22-spezifisch und FLS2-abhängig ist. Da FLS2 aber nicht allein an der Flagellin-abhängigen Signaltransduktion beteiligt ist, sondern weiterhin den Ko-Rezeptor BAK1 benötigt, wurden auch die transfizierten Zellen der *bak1-3* Mutante mit Flg22 behandelt. Auch hier ist eine keine signifikante Aktivierung der AtCPK5 zu erkennen.

Da neben Flagellin auch andere PAMPs eine Veränderung der Calciumkonzentration im Zellinneren verursachen (Aslam et al., 2008), wurde auch der bakterielle Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) daraufhin getestet, *At*CPK5 zu aktivieren. Analog zu Flagellin und Flg22 wurde auch für EF-Tu eine Peptidsequenz identifiziert, die in der Lage ist, pflanzliche Abwehrreaktionen auszulösen (Zipfel et al., 2006). Dieses 18 Aminosäure lange Peptid (Elf18) bindet an das als EFR (EF-Tu Rezeptor) bezeichnete Protein (Zipfel et al., 2006), das ebenfalls, wie FLS2, mit BAK1 interagiert (Chinchilla et al., 2007). Nach Behandlung der transfizierten Zellen konnte eine Aktivierung der *At*CPK5 in Col-0 WTund *fls2*-Zellen beobachtet werden, jedoch nicht in den *bak1-3*-Mutanten (Abb. 3.16). Auch dieses Ergebnis deutet auf eine Elf18-spezifische und EFR/BAK1-abhängige Reaktion hin.

Für NtCDPK2 konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der CDPK mit einer erhöhten Kinaseaktivität einhergeht (Romeis et al., 2001). Auch bei AtCPK5 und AtCPK6 ist eine erhöhte Kinaseaktivität nach Flg22-Behandlung zu erkennen, die im Fall der AtCPK5 mit dem veränderten Bandenmuster korreliert (Abb. 3.14). Nach Expression in Mesophyll-Protoplasten bleibt AtCPK5 für mindestens eine Stunde nach Flg22-Behandlung im aktivierten Zustand (Abb. 3.15). Bedenkt man allerdings, wie kurz das Calciumsignal nach Flg22-Behandlung in Keimlingen ist (Abb. 3.24), so stellt sich die Frage, wieso das Protein über einen so langen Zeitraum im aktiven Zustand bleibt. In transgenen FLS2-YFP-exprimierenden Pflanzen konnte beobachtet werden, dass der Flagellin-Rezeptor nach Bindung des Liganden in Vesikel internalisiert und abgebaut wird (Robatzek et al., 2006). Im Gegensatz dazu wird berichtet, dass dieser Effekt in Protoplasten nicht zu beobachten ist (Ali et al., 2007). Es ist daher denkbar, dass durch die fehlende Internalisierung und den dadurch verhinderten Abbau von FLS2 in den Protoplasten keine Abschaltung des Signals mehr erfolgen kann. Somit wird auch das Calciumsignal immer weiter aufrechterhalten, oder immer wieder von neuem aufgebaut und dadurch AtCPK5 aktiviert. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass ein Calcium-Impuls nur für die initiale Aktivierung des Proteins nötig ist, aber nicht für die Aufrechterhaltung der Kinaseaktivität.

#### 4.3.1 Auswirkung konstitutiv aktiver CPKs

Aufgrund der Tatsache, dass die in dieser Arbeit untersuchten Calcium-abhängigen Protein-Kinasen *At*CPK5 und *At*CPK6 in ihrer verkürzten konstitutiv aktiven Form (VK) nach Expression in *N. benthamiana* HR-ähnliche Zelltod-Symptome auslösen, wurde

auch die Auswirkung dieser konstitutiv aktiven Kinasen auf transfizierte Col-0 WT-Protoplasten untersucht.

Auffällig bei der Expression dieser VK-Varianten ist, dass die Proteinmenge im Vergleich zu dem Volllängen-Protein zum Teil so gering war, dass die Proteine nur schwer nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), obwohl bei allen Transfektionen die gleiche Anzahl an Zellen und die gleiche Menge DNA eingesetzt wurde.

Trotz dieser geringen Proteinmengen führte die Expression der *At*CPK5 VK-Variante auch im Protoplastensystem zum Absterben der Zellen. Dies zeigte sich sowohl bei der Ko-Transfektion von *At*CPK5 VK mit dem bakteriellen Effektor AvrPto und der Alantoat-Amido-Hydrolase (AAH) (Abb. 3.17), als auch bei der Anfärbung der Zellen mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) (Abb. 3.18).

Mit FDA und PI lassen sich lebende bzw. abgestorbene Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sehr leicht identifizieren (Jones und Senft, 1985). PI interkaliert, ähnlich dem Ethidiumbromid, mit DNA und emittiert unter dem Fluoreszenzmikroskop Licht im roten Spektralbereich. Es ist aber nicht in der Lage intakte Plasmamembranen zu durchdringen. FDA ist ein ungeladenes und in dieser Form ein nicht fluoreszierendes Molekül. Es kann jedoch intakte Plasmamembranen passieren und wird im Zellinneren von endogenen Esterasen hydrolysiert und somit zu dem grün fluoreszierenden Molekül Fluorescein umgewandelt. Daher lassen sich lebende Zellen grün und tote Zellen rot markieren und können so leicht unterschieden und ausgezählt werden.

In Abb. 3.18 wurde der Anteil toter Zellen nach der Transfektion mit der aktiven VK, der Kinase-inaktiven VK-Variante der AtCPK5 und H<sub>2</sub>O über einen Zeitraum von 18h beobachtet. Bis zwölf Stunden nach der Transfektion bleibt der Anteil toter Zellen bei allen Konstrukten unter 20%. Nach 18 Stunden steigt der Anteil toter Zellen in den Proben mit Kinase-aktiver VK-Variante sprunghaft auf 80% an. Der Anteil toter Zellen in den anderen Proben steigt dagegen nur leicht auf 20%.

Dieser Effekt lässt sich auch bei der Ko-Transfektion erkennen (Abb. 3.17). 16 Stunden nach Transfektion ist in den Ansätzen mit der aktiven Kinase kaum mehr Protein von AvrPto und AAH nachzuweisen. Dagegen ist sechs Stunden nach Transfektion kein Unterschied zwischen Ko-Transfektion von aktiver bzw. inaktiver Kinase hinsichtlich der Proteinmenge zu beobachten. Aufgrund dieser beiden Resultate wurde die Expressionszeit der konstitutiv aktiven VK-Varianten bei nachfolgenden Versuchen auf 6h nach Transfektion begrenzt, da zu diesem Zeitpunkt das Protein schon detektiert werden konnte, aber noch keine Zelltod-Symptome auftraten.

Darüber hinaus fällt auf, dass AtCPK5 VK, im Vergleich zur Kinase-inaktiven Vari-

ante, ein stressunabhängig verändertes Laufverhalten im SDS-Gel aufweist, welches der aktivierten Form des WT-Proteins ähnelt. (Abb. 3.17, Abb. 3.19). Dies lässt darauf schließen, dass die verkürzte konstitutiv aktive Variante der *At*CPK5 Calcium-unabhängig phosphoryliert wird.

Auch für *At*CPK6 VK kann ein leicht verändertes, stressunahängiges Laufverhalten der konstitutiv aktiven Kinase beobachtet werden (Abb. 3.19). Die Veränderung fällt aber weit weniger stark aus, als es bei der *At*CPK5 VK der Fall ist. Dieser, nur sehr gering ausfallende Effekt einer Phosphorylierung, kann auch der Grund für die nicht zu sehende Veränderung des Laufverhaltens des *At*CPK5 WT-Proteins nach Flg22-Behandlung sein.

Dieser Umstand ist um so erstaunlicher, wenn man berücksichtigt, wie eng verwandt *At*CPK5 und *At*CPK6 sind (Abb. 5.1). Beide Proteine besitzen, bezogen auf das gesamte Protein, 87% identische Aminosäuren, und selbst in der Variablen-Domäne liegt diese Übereinstimmung bei über 50% der Aminosäuren. Somit kann der beschriebene Effekt des veränderten Laufverhaltens im SDS-PAGE wahrscheinlich auf die, wenngleich auch geringen, Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Variablen-Domäne zurückgeführt werden.

### 4.3.2 Einfluss von CPKs auf die Aktivierung von pathogen-induzierten MAPK

Frühere Arbeiten der AG Romeis an Tabak konnten zeigen, dass Calcium-abhängige Protein-Kinasen die Aktivität von pathogen-induzierten MAPK beeinflussen können (Ludwig et al., 2005). Daher wurde auch in dieser Arbeit überprüft, ob die hier untersuchten Kinasen die Aktivierung von MAPK beeinflussen. Die Aktivierung von MAPK wird durch Phosphorylierungen an einer konservierten Aminosäuresequenz im so genannten *activation loop* initiiert (Nühse et al., 2000). Diese Phosphorylierung kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Miles et al., 2005). Aus diesem Grund wurde anstelle eines In-Gel-Kinase-Tests ein Western-Blot-Nachweis der phosphorylierten MAP-Kinasen durchgeführt.

In Abb. 3.19 wurden die konstitutiv aktiven Varianten der *At*CPK5, *At*CPK6 und *At*CPK28 in Protoplasten transfiziert und die Zellen anschließend mit 200 nM Flg22 behandelt. In allen Flg22-behandelten Proben war eine Induktion der MAPK-Phosphorylierung zu erkennen (Abb. 3.19). Diese fiel jedoch geringer aus, wenn die *At*CPK5 VK in den Zellen exprimiert wurde. Bei der Expression von *At*CPK6 VK und einer Kontroll-CPK aus einer anderen Subfamilie (*At*CPK28 VK) war keine Reduktion der MAPK-Phosphorylierung zu erkennen. Dieses Beobachtung für die *At*CPK5 VK deckt sich mit

Ergebnissen, die für *Nt*CDPK2 erhalten wurden (Ludwig et al., 2005). Bei Expression der konstitutiv aktiven *Nt*CDPK2 VK wurde eine Reduzierung der MAPK-Aktivierung nach Cf9/Avr9 Interaktion berichtet. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass es sich bei der Cf9/Avr9 Interaktion um eine Gen-für-Gen-Interaktion handelt, die eine Wirts-spezifische Resistenz vermittelt (Rowland et al., 2005). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Flg22-induzierten Abwehrreaktion um eine Nicht-Wirts-spezifische Reaktion, die im Unterschied zur Gen-für-Gen-Interaktion nicht zur hypersensitiven Reaktion und zum Zelltod führt (Gomez-Gomez und Boller, 2002).

Obwohl es sich bei den Wirts- und Nicht-Wirts-spezifischen Reaktionen um unterschiedliche Abwehrmechanismen handelt, kommt es in beiden Fällen zur Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden (Asai et al., 2002; Ludwig et al., 2005). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in beiden Fällen Calcium-abhängige Protein-Kinasen über einen negativen feedback Mechanismus regulierend auf MAPK wirken könnten. Die Expressionsanalysen an transgenen *At*CPK5-YFP überexprimierenden Pflanzen zeigen jedoch, dass die Expression des MAPK-abhängigen und Flg22 induzierten Gens *Flg22-induced Receptor-like Kinase 1 (FRK1)*, sowie *pathogenisis-related 1 (PR1)* und Isochorismat-Synthase 1 (*ICS1*) stark erhöht ist. *ICS1* ist an der Bildung von Salicylsäure (SA) nach Pathogeninfektion beteiligt. Zudem besitzen *ics1*-Mutanten eine stark verringerte Basal-Abwehr (Wildermuth et al., 2001; Durrant und Dong, 2004). SA ist wiederum für die Aktivierung lokaler Abwehrreaktionen wichtig. Darüber hinaus induziert SA unter anderem die Expression von *PR1* und führt zur Ausbildung der so genannten systemischerworbenen Resistenz (SAR) (Durner et al., 1997; Feys und Parker, 2000; Durrant und Dong, 2004).

Eine Erklärung für diese Diskrepanz zwischen der von *At*CPK5-VK hervorgerufenen Inhibierung von MAP-Kinasen einerseits und der erhöhten *FRK1*-Expression andererseits könnte sein, dass die Expression von *FRK1* nicht nur durch MAP-Kinasen reguliert wird. *Genevestigator*-Analysen zeigen eine vierfach erhöhte *FRK1*-Expression nach Behandlung mit Benzothiadiazole (BTH) (Daten nicht gezeigt). BTH ist ein SA-Analogon und führt, wie SA zur Ausbildung einer SAR (Lawton et al., 1996; Conrath et al., 2002). Es ist daher denkbar, dass die erhöhte *FRK1*-Expression auf eine CDPK-abhängig erhöhte SA-Konzentration in den transgenen Pflanzen zurückgeführt werden kann. In diesem Fall könnten CDPKs dennoch regulatorisch auf MAP-Kinasen einwirken. Um zu zeigen, ob die in den Protoplasten beobachteten Effekte auch *in planta* relevant sind, müssen weitere Untersuchungen an MAP-Kinase abhängigen Genen, wie z. B. *GST1* und *WRKY29*, nach Flg22-Behandlung durchgeführt werden. Eine weitere wichtige Frage, gerade in Bezug auf die erhöhte Expression von *ICS1* und *PR1*, ist, ob die transgenen Überexpressions-Pflanzen schon von Anfang an in einem SAR-vergleichbaren Zustand sind. Hierzu bieten sich weitere RT-PCR-Experimente mit SAR-spezifischen Markergenen an. Weiterhin sollte die Konzentration von SA in den *At*CPK5-YFP exprimierenden Linien im Vergleich zum Col-0 WT unter Kontrollbedingungen und nach Pathogenstress untersucht werden. Auch Kreuzungen mit Pflanzen, die eine bakterielle Salicylsäure-hydroxylase (*NahG*) exprimieren, können helfen die Frage zu klären, ob die beobachteten Effekte auf ein erhöhte SA-Konzentration in den Pflanzen zurückzuführen sind.

Darüber hinaus könnte auch versucht werden, transgene Pflanzen, welche die verschiedenen *At*CPK5-Konstrukte unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters exprimieren (z. B. Dexamethason), zu nutzen. Durch die Applikation von Dexamethason in ein Blatt der Pflanze, ließe sich so testen, ob die lokale Überexpression von *At*CPK5 zu einer erhöhten systemischen Resistenz in den anderen, nicht induzierten, Pflanzenteilen führen könnte.

# 4.4 Identifizierung und Charakterisierung von Phosphorylierungsstellen in *At*CPK5

Die Phosphorylierung als post-translationale Modifikation ist ein weit verbreiteter Mechanismus der Proteinregulation. Die Aktivität von CDPKs wird sehr wahrscheinlich durch diese Modifikation reguliert. Für *Nt*CDPK2 konnte gezeigt werden, dass diese Kinase sowohl von sich selbst, als auch von einer bislang unbekannten Kinase phosphoryliert wird, und dass diese Phosphorylierungen für dessen Aktivität wichtig sind (Witte und Romeis, unveröffentlicht). 2006 identifizierten Hegeman et al. *in vitro*-Phosphorylierungsstellen von mehreren rekombinant synthetisierten CPKs aus *Arabidopsis*, darunter auch für die *At*CPK5 (Hegeman et al., 2006). Bei ihren Analysen identifizierten sie zwei Phosphopeptide für die *At*CPK5, wobei das erste eine Phosphorylierung an der Aminosäure S8 besaß. Beim zweiten Phosphopeptid konnte nicht unterschieden werden ob nur die Aminosäure T98 bzw. S100 oder beide Aminosäuren gleichzeitig phosphoryliert waren (Hegeman et al., 2006).

Anhand dieser Untersuchungen lassen sich jedoch keine Aussagen über die *in vivo*-Funktion dieser Phosphorylierungen machen, und es konnte nicht geklärt werden, ob diese Phosphorylierungen *in vivo* überhaupt vorkommen. Aus diesem Grund wurden diese *in vitro* identifizierten Phosphorylierungsstellen für *At*CPK5 entweder durch ein Alanin (A) bzw. durch ein Aspartat (D) ersetzt. Der Austausch gegen Alanin bewirkt einen Verlust der jeweiligen Phosphorylierung, wohingegen das Aspartat auf Grund seiner negative Ladung, eine Phosphorylierung vortäuscht. Die so modifizierten Proteine wurden in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten exprimiert und mit Flg22 behandelt (Abb. 3.20).

Der Austausch der Aminosäure S8 führte in beiden Fällen zu einem Flg22-insensitiven Protein, jedoch mit unterschiedlichem Laufverhalten. Ohne eine mögliche Phosphorylierung an dieser Aminosäure (S8A) gleicht das Bandenmuster der Kinase-inaktiven Variante. Der Aminosäureaustausch S8D hingegen führte zu einem Protein, dass auch ohne Flg22-Stimulus ein verändertes Laufverhalten aufweist. Allerdings kommt es bei dieser Mutation nicht zu einer vollständigen Verschiebung zugunsten der beim WT-Protein beobachteten induzierten Form. Vielmehr ist eine weitere, bislang nicht beobachtete Bande zu erkennen, die in ihrem Laufverhalten zwischen der aktivierten und nicht-aktivierten Form der *At*CPK5 steht. Dies zeigt, dass die Aminosäure S8 notwendig, aber nicht hinreichend, für den beobachteten Effekt ist. Im Gegensatz dazu ist bei der T98A/S100A-Mutation keinerlei Effekt auf das Flg22-induzierte Bandenmuster der *At*CPK5 zu erkennen. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass hier keine *in vivo*-Phosphorylierung stattfinden kann. Es zeigt lediglich, dass diese Aminosäuren nicht für das durch Flg22induzierte veränderte Laufverhalten verantwortlich sind (Abb. 3.20).

Um weitere Flg22-induzierte *in vivo*-Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, wurden in Kooperation mit der AG Schulze (MPIMP Golm) LC-MS/MS-Messungen durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich sequenzspezifische Phosphorylierungen nachweisen. Das *At*CPK5-Protein wurde in Protoplasten exprimiert, nach Flg22-Stimulus gereinigt und vor der LC-MS/MS-Messung mit Trypsin verdaut. Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Peptide zeigen die in diesen Messungen identifizierten Phosphopeptide. Auffällig ist das Fehlen der von Hegeman et al. (2006) beschriebenen Peptide. Dies könnte daran liegen, dass die Identifizierung der Phosphopeptide in den bislang vorgenommenen Untersuchungen automatisch durchgeführt, und daher nicht als solche identifiziert wurden. Neue Messungen mit manueller Auswertung der Peptidsequenzen müssen zeigen, ob die von Hegeman et al. (2006) identifizierten Peptide auch *in vivo* nach Flg22-Behandlung phosphoryliert werden. Es ist davon auszugehen, dass zumindest die Phosphorylierung von S8 auch *in vivo* gefunden werden kann, da die Mutation dieser Aminosäure einen starken Einfluss auf die Flg22-induzierte Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE hat (Abb. 3.20).

Interessant ist weiterhin, dass sowohl beim Kinase-aktiven als auch beim Kinaseinaktivem Protein Phosphorylierungen nachgewiesen werden konnten. Das Peptid NSL- NISMR (Aminosäuren 547-554 in der Calmodulin-ähnlichen Domäne) trägt beim Kinase-aktiven Protein an beiden Serinresten jeweils ein Phosphat, bei der Kinaseinaktiven Form ist hingegen nur das erste Serin dieses Peptides phosphoryliert. Dies deutet darauf hin, dass dieses Peptid sowohl von *At*CPK5 selbst, als auch von einer anderen Kinase phosphoryliert wird. Weitergehende Untersuchungen mit elizitiertem und nicht elizitiertem Protein müssen zeigen, ob und welche dieser Phosphorylierungen konstitutiv vorhanden sind, und welche durch die Flg22-Behandlung induziert sind.

Um die Kinase zu identifizieren, welche für die Phosphorylierung von *At*CPK5 verantwortlich ist, wurden Hefe-2-Hybrid Untersuchungen gestartet. Es liegen allerdings noch keine Ergebnisse vor. Neben dem Hefe-2-Hybrid-Ansatz ist auch ein BiFC-Screen in Kooperation mit der AG Harter an der Universität Tübingen geplant, um potentielle *in vivo*-Interaktionspartner zu identifizieren. Ein weiterer Ansatz besteht darin, den *At*CPK5-StrepII-KinaseX-Komplex mittels Formaldehyd chemisch kovalent zu vernetzen, affinitätschromatographisch aufzureinigen und die so gebundenen Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

# 4.5 Phänotypische Untersuchungen von AtCPK5-YFP Überexpressionslinien

Neben KO-Mutanten stellen Überexpressionslinien eine weitere Möglichkeit dar, die Funktionen von Proteinen zu untersuchen. Die zur *in vivo*-Lokalisierung generierten *At*CPK5-YFP-Pflanzen entwickeln unter normalen Anzuchtbedingungen (8h Licht, 20°C Temperatur und 60% Luftfeuchte) von den Blatträndern her stärker werdende Chlorosen und Nekrosen, die bei Col-0 WT-Pflanzen nicht zu erkennen sind (Abb. 3.25). Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp beruht auf den Beobachtungen, die bei der transienten Expression der *At*CPK5-VK in *N. benthamiana*-Blättern (Komander und Romeis, unveröffentlicht) und in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten (Abb. 3.18, 3.17) gemacht wurden. In beiden Fällen starben die *At*CPK5-VK exprimierenden Zellen innerhalb von 3-4 Tagen (*N. benthamiana*) bzw. von 20h (Protoplasten) nach Transformation. Aufgrund des relativ großen C-terminal fusionierten YFP (ca. 27 kDa) könnte es zu einer Inhibition bzw. Verlangsamung der Rückfaltung der autoinhibitorischen Domäne der aktivierten Kinase kommen. Das Protein wäre daher länger aktiv und wäre so in der Lage, einen ähnlichen Effekt wie das verkürzte konstitutiv aktive Protein hervorzurufen.

Vorläufige Beobachtungen an transgenen Pflanzen, die ein AtCPK5-StrepII-Fusionsprotein überexprimieren, zeigten keine chlorotischen Bereiche an den Blättern (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist das *At*CPK5-StrepII Fusionsprotein im Western Blot wesentlich schlechter nachzuweisen, als das YFP-markierte Protein. RT-PCRs müssen zeigen ob die Expression der jeweiligen Transgene vergleichbar stark ist, und ob das Fehlen der Chlorosen in den *At*CPK5-StrepII Pflanzen nicht einfach auf unterschiedliche Expressionsmengen zurück geführt werden kann. Da die StrepII-Markierung jedoch wesentlich kleiner als das YFP ist, besteht auch die Möglichkeit, dass es die Rückfaltung der Kinase weniger stark behindert. Dies würde die Theorie des deregulierenden Einflusses des C-terminalen YFP-Proteins unterstützen. Die Selektion und Analyse der *At*CPK5-StrepII exprimierenden Pflanzen ist im Moment jedoch noch nicht abgeschlossen.

Aufgrund der beobachteten Chlorosen bzw. Nekrosen und der zum Teil sehr starken Wachstumsdifferenz der Pflanzen (Abb. 3.26 A, 3.27 A) wurden nähere Analysen dieser *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen durchgeführt. In RT-PCR Experimenten (Abb. 3.26 B) konnte in allen transgenen Pflanzen ein *AtCPK5-YFP* spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden. Pflanzen die dem Col-0 WT hinsichtlich des Wachstums relativ ähnlich waren, wiesen eine vergleichbare Menge an *AtCPK5-YFP*-Transkript auf, wie Pflanzen mit einem starken Phänotyp (Abb 3.26). Auch die Proteinmengen des *At*CPK5-YFP-Konstruktes lassen sich nicht mit der Stärke des Phänotyps korrelieren (Abb. 3.27 B).

Wie bereits erwähnt, lassen sich in den transgenen Pflanzen auch erhöhte Transkriptmengen von *ICS1* nachweisen (Abb. 3.26). Dies lässt vermuten, dass diese Pflanze mehr Salicylsäure besitzen, als die Col-0 WT-Pflanzen. Zhang et al. konnten 2007 zeigen, dass eine Doppelmutation der Syntaxine *syp121/syp122* zu zwergenhaften Pflanzen mit nekrotischen Blättern führt, die darüber hinaus auch erhöhte Mengen an Salicylsäure besitzen. Erhöhte SA-Mengen wurden auch bei den Mutanten *signal responsive 1 (sr1)* (Du et al., 2009), *suppressor of salicylate insensitivity of npr1-5 (ssi1)* (Shah et al., 1999), *constitutive expression of pr-genes22 (cpr22)* (Yoshioka et al., 2006) und *accelerated cell death 6 (acd6)* (Rate et al., 1999) gemessen. All diese Mutanten weisen ein verringertes Wachstum und die Bildung von Chlorosen und Nekrosen auf, die denen der *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen sehr ähneln. Zusammen mit den Expressionsdaten von *PR1* und *ICS1* legt dies den Schluss nahe, dass auch der durch *At*CPK5-YFP verursachte Phänotyp auf eine konstitutiv erhöhte SA-Konzentration zurückzuführen ist. Dies muss aber durch Messungen der SA-Konzentration in transgenen Pflanzen bestätigt werden.

Es ist bekannt, dass eine erhöhte SA-Konzentration und eine konstitutive Expression

von *PR1* zu einer verstärkten Resistenz gegenüber dem hemibiotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 führt (Lee et al., 2007). Aufgrund der erhöhten *ICS1-* und *PR1-*Expression in den *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen wurde daher getestet, ob diese Pflanzen eine veränderte Resistenz gegenüber *Pst* DC3000 aufweisen (Abb 3.28). Da die *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen auch ohne Pathogeninfektion Chlorosen und Nekrosen ausbilden (Abb. 3.25) ist eine genaue Einschätzung der Symptome sehr schwierig. Aus diesem Grund ist sehr wahrscheinlich davon auszugehen, dass die chlorotischen Bereiche, die sich nach der Infektion mit *Pst* hrcC<sup>-</sup> ausgebildet haben, nicht durch das Bakteriumwachstum verursacht, sondern durch die *At*CPK5-YFP-Expression selbst hervorgerufen wurden.

Im Gegensatz dazu können nach Infektion mit *Pst* DC3000 in Col-0 WT-Pflanzen stärkere Chlorosen beobachtet werden, als in *At*CPK5-YFP exprimierenden Pflanzen. Dies weist auf eine erhöhte Resistenz hin, und würde die postulierte, durch *At*CPK5-YFP induzierte systemisch erworbene Resistenz bestätigen. Eine bessere Aufklärung der Frage, ob die Expression von *At*CPK5-YFP zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Pst* DC3000 führt, könnte eine Bakterienwachstumskurve liefern. Im Falle einer erhöhten Resistenz sollte das Bakterienwachstum in den transgenen Pflanzen verringert sein.

## 4.6 Funktion von *At*CPK5 und *At*CPK6 in der Pathogenabwehr

Werden alle Daten und Hinweise aus der bekannten Literatur und dieser Arbeit zusammengefasst, lässt sich folgendes, vorläufiges Modell postulieren (Abb. 4.1). Pflanzen erkennen die Anwesenheit von Pathogenen anhand von PAMPs (Nürnberger et al., 2004). Im Fall von Flagellin und EF-Tu werden diese PAMPs von den membranständigen Leucin-reichen Rezeptor-ähnlichen Kinasen FLS2 bzw. EFR erkannt. Beide Rezeptoren benötigen den Ko-Rezeptor BAK1, um das aufgenommene Signal mittels Phosphorylierung ins Zellinnere weiterzuleiten (Chinchilla et al., 2007). Dieses Signal wird von einer MAPK-Kaskade weiter übertragen bis es schließlich unter anderem zur Expression von pathogenrelevanten Genen wie *FRK1* und dem Transkriptionsfaktor *WRKY29* kommt (Asai et al., 2002; Xiang et al., 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aber nicht nur die MAP-Kinasen 3 und 6 durch PAMPs aktiviert werden.

Parallel zu den MAP-Kinasen werden innerhalb von fünf Minuten, die Calciumabhängigen Protein-Kinasen *At*CPK5 und *At*CPK6 aktiviert. Dabei führt zumindest die Expression der konstitutiv aktiven Variante der *At*CPK5 zu einer Inhibition der Phosphorylierung der MAP-Kinase 3 und 6 an dem für die Aktivierung dieser Kinasen wichtigen *activation-loop*. Darüber hinaus zeigen transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die das *At*CPK5-YFP Fusionsprotein exprimieren, eine erhöhte Expression des durch Salicylsäure induzierten Gens *PR1* und eine erhöhte Expression des an der Salicylsäuresynthese beteiligten Gens *ICS1*.



Abbildung 4.1 Modell der MAPK- und CDPK-abhängigen Signaltransduktion nach PAMP-Erkennung: Nach Perzeption von Flagellin bzw. Ef-Tu durch FLS2 und EFR, kommt es unter Beteiligung von BAK1 zur Aktivierung der MAPK-abhängigen Signaltransduktion und zur Expression von frühen Stressgenen wie *FRK1* und *WRKY29* (linke Seite, Asai et al., 2002). Parallel dazu werden aber auch die Calcium-abhängigen Protein-Kinasen *At*CPK 5 und 6 biochemisch aktiviert. Diese inhibieren direkt oder indirekt die Aktivierung der MAPK-Kaskade und fördern ihrerseits die Expression von spät induzierten Genen wie *ICS1* und *PR1*. Ob und inwieweit von Pathogenen gebildete Effektorproteine neben der MAPK-Kaskade auch die CDPK-abhängige Signaltransduktion beeinflussen ist noch nicht bekannt. Auch die Frage, ob CDPKs eventuell auch andere Phytohormon-abhängige Signale beeinflussen, bleibt noch zu klären.

Aufgrund dieser Daten kann man postulieren, dass Calcium-abhängige Protein-Kinasen möglicherweise an der Regulation des Übergangs von sehr schnellen und akuten, zu späteren und länger andauernden Abwehrreaktionen, wie der systemischerworbene Resistenz, beteiligt sind. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass die systemisch-erworbene Resistenz nur durch die Bildung von nekrotischem Gewebe hervorgerufen wird, wobei es sich einerseits um das Ergebnis einer R-Gen vermittelten Abwehrreaktion handeln, aber auch das Resultat einer erfolgreichen Infektion sein kann (Durrant und Dong, 2004). 2007 konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die PAMPs Flg22 und LPS, die alleine appliziert keinerlei Nekrosen hervorrufen, eine SAR auslösen (Mishina und Zeier, 2007). Dies stützt die These der Funktion des molekularen Schalters in Form von Calcium-abhängigen Protein-Kinasen. Es bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen um diese These zu bestätigen. Zur Klärung dieser Frage werden zur Zeit Luciferase-Reporter-Tests mit Promotersequenzen von Salicylsäure-, Ethylen- und Jasmonsäure-Markergenen in Abhängigkeit von Flg22 und *At*CPK5 durchgeführt.

Ein weiterer sehr interessanter Punkt ist die Frage, ob CDPKs, ähnlich wie die PAMP-Rezeptoren FLS2 und EFR, Ziele für pathogene Effektorproteine sind. Effektorproteine sollen das pflanzliche Immunsystem unterdrücken und so die Infektion durch das Pathogen begünstigen (Underwood et al., 2007; Zhang et al., 2007; Block et al., 2008). Einige der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass zumindest *At*CPK5 an der Regulation der SA-abhängigen Pathogenabwehr beteiligt sein könnte. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Effektorproteine auch an dieser Stelle eine Veränderung der normalen Signaltransduktion verursachen. Zur Klärung dieser Frage könnte, wie auch zur Identifizierung von endogenen Interaktionspartnern, eine chemische Vernetzung von *At*CPK5 und dem Effektorprotein, nach Infektion mit Pathogenen, genutzt werden.

Obwohl die Proteinklasse der CDPKs schon seit mehr als 25 Jahren bekannt ist, sind bislang keine *in vivo*-Interaktionspartner zweifelsfrei identifiziert und durch reverse Genetik bestätigt worden. Aufgrund der Tatsache, dass die *Atcpk3/Atcpk6*-Doppelmutante eine veränderte ABA-abhängige Reaktion von Anionenkanälen aufweist (Mori et al., 2006) kann man vermuten, dass diese Kanäle direkte Interaktionspartner für CDPKs sein könnten.

Mori et al. (2006) diskutieren darüber hinaus auch die Möglichkeit, dass noch weitere, bislang unbekannte CDPKs, die Regulation von Ionenströmen in Schließzellen beeinflussen. Zusammen mit den Ergebnissen von Melotto et al. (2008) die zeigen, dass *Pseudomonas syringae* aktiv das Schließen der Stomata verhindert, und der Tatsache, dass auch *At*CPK5 in Schließzellen exprimiert wird (Yang et al., 2008 und eigene Daten, nicht gezeigt) könnte es eventuell sinnvoll sein, eine dreifach *Atcpk3/Atcpk5/Atcpk6-*Mutante herzustellen und diese in patho-physiologischen Tests einzusetzen.

Ein weiterer potentieller Kandidat für eine Interaktion mit *At*CPK5 könnte *At*SR1/CAMTA3 (*At*SR1) sein. *At*SR1 ist ein Calmodulin-bindender Transkriptionsfaktor und *Atsr1*-Mutanten zeigen eine konstitutiv erhöhte Konzentration von SA, eine kon-

stitutive Expression von *PR1* und *ICS1* und an den Blättern dieser Pflanzen entwickeln sich Pathogen-unabhängig chlorotische Bereiche (Du et al., 2009). Beide Proteine werden durch Calcium entweder direkt (*At*CPK5) oder indirekt (*Ar*SR1 durch Calmodulin) reguliert. Es ist daher vorstellbar, dass *At*CPK5 ein negativer Regulator der *At*SR1-Funktion sein könnte. Dies würde auch den in den *At*CPK5-YFP überexprimierenden Pflanzen festgestellten Phänotyp erklären.

Aufgrund der Tatsache, dass AtSR1 für seine Funktion eine Interaktion mit Calmodulin benötigt (Du et al., 2009), sind zwei Möglichkeiten denkbar wie AtCPK5 diese Funktion beeinflussen könnte. I) Obwohl AtSR1 als Transkriptionsfaktor hauptsächlich im Kern vorzufinden ist, konnte dennoch auch ein geringer Anteil von AtSR1-Protein im Cytoplasma lokalisiert werden (Yang und Poovaiah, 2002). Dies lässt die Möglichkeit einer direkten Phosphorylierung von AtSR1 durch AtCPK5 offen. Diese Phosphorylierung könnte bewirken, dass AtSR1 im Cytoplasma zurückgehalten wird und daher keine inhibitorische Wirkung mehr hat. II) Möglich ist aber auch eine Interaktion von AtCPK5 mit dem AtSR1 regulierendem Calmodulin-Protein. Aus dem tierischen System ist bekannt, dass Calmodulin-Proteine signalspezifisch aus dem Cytoplasma in den Zellkern wandern können (Toutenhoofd und Strehler, 2000). Zudem ist bekannt, dass eine Ser/Thr-Phosphorylierung von Calmodulin zu einer verringerten Bindungsaffinität und Aktivierung der Calmodulin-regulierten Proteine führt (Toutenhoofd und Strehler, 2000). Da die Funktion von AtSR1 Calmodulin-abhängig ist (Yang und Poovaiah, 2002; Du et al., 2009) kann man vermuten, das das AtSR1-aktivierende Calmodulin-Protein von AtCPK5 phosphoryliert, und somit an einer möglichen Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern gehindert wird.

## 4.7 Ausblick

Die Ernährung der heutigen Weltbevölkerung beruht zum größten Teil auf lediglich 14 unterschiedlichen Kulturpflanzen, unter ihnen Weizen, Reis und Kartoffel. Bei all diesen Pflanzen kommt es zum Teil immer wieder zu katastrophalen Ernteausfällen, die durch phytopathogene Organismen verursacht werden. Das Problem wird zusätzlich dadurch verschärft, dass viele Kulturpflanzen über die Zeit zu immer ertragreicheren Sorten gezüchtet wurden, die jedoch natürliche Resistenzmechanismen verloren haben (Strange und Scott, 2005).

Heutzutage wird versucht, natürliche Resistenzen durch Kreuzungen in genutzte Kulturpflanzen wieder einzubringen. Sehr leicht zugänglich sind dabei R-Gen spezifische Mechanismen, da sie nur durch ein Gen bestimmt werden. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass diese R-Gen vermittelten Resistenzen nur gegen ein bestimmtes Pathogen wirken und zum Teil sehr schnell vom diesen wieder gebrochen werden können (Poland et al., 2009).

Alternativ zur R-Gen vermittelten Resistenz wird versucht, die Basal-Abwehr der Pflanzen zu stärken. Dieser Prozess ist jedoch wesentlich langwieriger, da in diesem Fall viele unterschiedliche Genprodukte mit zum Teil synergistischer oder aber antagonistischer Wirkung zusammenspielen müssen. Der entscheidende Vorteil ist jedoch, dass diese Art der Resistenz gegen mehrere Pathogene wirkt und nicht so schnell von diesen umgangen werden kann. (Poland et al., 2009).

Aus diesem Grund ist es wichtig, das noch unvollständige Bild der basalen Pathogenabwehr zu vervollständigen. Eine entscheidender Teil ist dabei die Signaltransduktion. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CDPKs die Pathogen-abhängige Signaltransduktion verändern können. Die nähere Untersuchung und ein besseres Verständnis dieser Komponente der Pathogenabwehr, und der Transfer dieses Wissens auf agrarökonomisch relevante Pflanzen, könnte zu gezielten Züchtung führen, die bei verringertem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen aufweisen.

## Literatur

- Abbasi F, Onodera H, Toki S, Tanaka H und Komatsu S (2004) OsCDPKI3, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. Plant Molecular Biology **55**(4): 541–552
- Abramovitch R, Kim Y, Chen S, Dickman M und Martin G (2003) Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. EMBO Journal **22**(1): 60–69
- Aderem A und Ulevitch R (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature **406**(6797): 782–787
- Ali GS, Prasad KVSK, Day I und Reddy ASN (2007) Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an Arabidopsis receptor-like kinase. Plant and Cell Physiology **48**(11): 1601–1611
- Allwood E, Smertenko A und Hussey P (2001) Phosphorylation of plant actindepolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. FEBS Letters **499**(1-2): 97–100
- Alonso J, Stepanova A, Leisse T, Kim C, Chen H, Shinn P, Stevenson D, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers C, 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 D, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby W, Berry C und Ecker J (2003) Genome-wide Insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301(5633): 653–657
- Andreotti G, Freeman L, Hou L, Coble J, Rusiecki J, Hoppin J, Silverman D und Alavanja M (2008) Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. Int J Cancer 26(Early View online publication)
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM und Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature 415(6875): 977–983
- Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR und Cooper RM (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. Current Biology 18(14): 1078–1083
- Asselbergh B, De Vleesschauwer D und Hofte M (2008) Global switches
and fine-tuning - ABA modulates plant pathogen defense. Molecular Plant-Microbe Interactions 21(6): 709–719

- Banba M, Gutjahr C, Miyao A, Hirochika H, Paszkowski U, Kouchi H und Imaizumi-Anraku H (2008) Divergence of Evolutionary Ways Among Common sym Genes: CASTOR and CCaMK Show Functional Conservation Between Two Symbiosis Systems and Constitute the Root of a Common Signaling Pathway. Plant and Cell Physiology 49(11): 1659–1671
- Benetka W, Mehlmer N, Maurer-Stroh S, Sammer M, Koranda M, Neumueller R, Betschinger J, Knoblich JA, Teige M und Eisenhaber F (2008) Experimental testing of predicted myristoylation targets involved in asymmetric cell division and calcium-dependent signalling. Cell Cycle 7(23): 3709–3719
- Berkowitz G, Zhang X, Mercier R, Leng Q und Lawton M (2000) Coexpression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K+ channel KAT1 alters current parameters in Xenopus laevis oocytes. Plant and Cell Physiology **41**(6): 785–790
- **Bisgrove SR, Simonich MT, Smith NM, Sattler A** und **Innes RW** (1994) A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for two different pathogen avirulence genes. Plant Cell **6**(7): 927–933
- Block A, Li G, Fu ZQ und Alfano JR (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. Current Opinion In Plant Biology 11(4): 396–403
- Blume B, Nürnberger T, Nass N und Scheel D (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. Plant Cell **12**(8): 1425–1440
- Chandran V, Stollar E, Lindorff-Larsen K, Harper J, Chazin W, Dobson C, Luisi B und Christodoulou J (2006) Structure of the regulatory apparatus of a calciumdependent protein kinase (CDPK): A novel mode of calmodulin-target recognition. Journal of Molecular Biology 357(2): 400–410
- Chen KM, Wu GL, Wang YH, Tian CT, Samaj J, Baluska F und Lin JX (2008) The block of intracellular calcium release affects the pollen tube development of Picea wilsonii by changing the deposition of cell wall components. Protoplasma 233(1-2): 39–49
- Cheng S, Willmann M, Chen H und Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. Plant Physiology 129(2): 469–485
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nuernberger T, Jones JDG, Felix G und Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature **448**(7152): 497–U12
- Chisholm ST, Coaker G, Day B und Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell **124**(4):

803-814

- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y und Grill E (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. Plant Biology 8(3): 314–325
- **Clouse S** (1996) Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. Plant Journal **10**(1): 1–8
- **Clouse S** (2002) Brassinosteroid signal transduction: Clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. Molecular Cell **10**(5): 973–982
- **Colcombet J** und **Hirt H** (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. Biochemical Journal **413**: 217–226
- **Conrath U**, **Pieterse C** und **Mauch-Mani B** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends In Plant Science 7(5): 210–216
- Creutzig A und Alexander K (1985) Ergotism. Deutsche medizinische Wochenschrift 110(37): 1420–1422
- **Dallo S, Kannan T, Blaylock M** und **Baseman J** (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae. Molecular Microbiology **46**(4): 1041–1051
- **Dangl J** und **Jones J** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature **411**(6839): 826–833
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I und Hirt H (2007) Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: Abusing MAPK defense signaling. Science 318(5849): 453–456
- **Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ** und **Thomashow MF** (2009) Roles for Arabidopsis CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. Plant Cell **21**(3): 972–984
- **Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy ASN** und **Poovaiah BW** (2009) Ca2+/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. Nature **457**(7233): 1154–U116
- **Durner J**, **Shah J** und **Klessig D** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends In Plant Science 2(7): 266–274
- **Durrant W** und **Dong X** (2004) Systemic Acquired Resistance. Annual Review of Phytopathology **42**(1): 185–209
- 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 Research **19**(6): 1349

- Felix G, Duran JD, Volko S und Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant Journal 18(3): 265–276
- **Feys B** und **Parker J** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends In Genetics **16**(10): 449–455
- Flor H (1955) Host-parasite interactions in flax rust its genetics and other implications. Phytopathology **45**: 680–685
- Flors C und Nonell S (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: Phototoxic phenalenone phytoalexins. Accounts of Chemical Research **39**(5): 293–300
- **Franz S** (2008) Charakterisierung der CDPKs CPK21 und CPK23 aus Arabidopsis thaliana. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin
- Freymark G, Diehl T, Miklis M, Romeis T und Panstruga R (2007) Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calciumdependent protein kinases (CDPKs). Molecular Plant-Microbe Interactions 20(10): 1213–1221
- Galon Y, Nave R, Boyce JM, Nachmias D, Knight MR und Fromm H (2008) Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in Arabidopsis. FEBS Letters **582**(6): 943–948
- **Ganguly S** und **Singh M** (1998) Characterization of a second calcium-dependent protein kinase from winged bean. Phytochemistry **48**(1): 61–70
- **Gohre V** und **Robatzek S** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. Annual Review of Phytopathology **46**: 189–215
- **Gomez-Gomez L, Bauer Z** und **Boller T** (2001) Both the extracellular leucinerich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. Plant Cell **13**(5): 1155–1163
- **Gomez-Gomez L** und **Boller T** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends in Plant Science **7**(6): 251–256
- Gomez-Gomez L, Felix G und Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. Plant Journal 18(3): 277–284
- Granato D, Bergonzelli G, Pridmore R, Marvin L, Rouvet M und Corthesy-Theulaz I (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. Infection and Immunity **72**(4): 2160–2169
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A und Mansfield J (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. Plant Journal 23(4): 441–450

- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM und Dangl JL (2006) Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. Annual Review of Microbiology **60**: 425–449
- **Greenberg J** und **Yao N** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology **6**(3): 201–211
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Gotz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G und Nürnberger T (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 282(44): 32338– 32348
- Hann DR und Rathjen JP (2007) Early events in the pathogenicity of Pseudomonas syringae on Nicotiana benthamiana. Plant Journal **49**(4): 607–618
- Harmon A, Yoo B und McCAFFERY C (1994) Pseudosubstrate inhibition of a CDPK, a Protein-Kinase with a Calmodulin-like Domain. Biochemistry 33(23): 7278–7287
- Harper J, Breton G und Harmon A (2004) Decoding Ca2+ signals through plant protein kinases. Annual Review of Plant Biology **55**: 263–288
- **Harper J** und **Harmon A** (2005) Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**(7): 555–566
- Harper J, Huang J und Lloyd S (1994) genetic Identification of an autoinhibitor in CDPK, a Protein-Kinase with a Calmodulin-like Domain. Biochemistry 33(23): 7267–7277
- He P, Shan L, Lin N, Martin G, Kemmerling B, Nürnberger T und Sheen J (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. Cell 125(3): 563–575
- **Heath M** (2000a) Hypersensitive response-related death. Plant Molecular Biology **44**(3): 321–334
- **Heath M** (2000b) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Current Opinion In Plant Biology **3**(4): 315–319
- Hegeman AD, Rodriguez M, Han BW, Uno Y, Phillips GNJ, Hrabak EM, Cushman JC, Harper JF, Harmon AC und Sussman MR (2006) A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calciumdependent protein kinases. Proteomics 6(12): 3649–3664
- Henikoff S, Till B und Comai L (2004) TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. Plant Physiology 135(2): 630–636
- **Hetherington A** und **Brownlee C** (2004) The generation of Ca2+ signals in plants. Annual Review of Plant Biology **55**: 401–427
- Hetherington A und Trewavas A (1982) Calcium-dependent protein kinase in pea shoot membranes. FEBS Letters 145: 67–71

- **Huang J, Teyton L** und **Harper J** (1996) Activation of a Ca2+-dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. Biochemistry **35**(40): 13222–13230
- **Hwang I, Sze H** und **Harper J** (2000) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca2+ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6224–6229
- Infante-Rivard C und Weichenthal S (2007) Pesticides and childhood cancer: An update of Zahm and Ward's 1998 review. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews **10**(1-2): 81–99
- **Ingle RA**, **Carstens M** und **Denby KJ** (2006) PAMP recognition and the plantpathogen arms race. Bioessays **28**(9): 880–889
- Ishida S, Fukazawa J, Yuasa T und Takahashi Y (2004) Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OFSHOOT GROWTH by Gibberellins. Plant Cell 16(10): 2641–2651
- Ishida S, Yuasa T, Nakata M und Takahashi Y (2008) A Tobacco Calcium-Dependent Protein Kinase, CDPK1, Regulates the Transcription Factor RE-PRESSION OF SHOOT GROWTH in Response to Gibberellins. Plant Cell
- Janeway CAJ und Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. Annual Review of Immunology 20: 197–216
- Jonak C, Ligterink W und Hirt H (1999) MAP kinases in plant signal transduction. Cell Mol Life Sci 55(2): 204–213
- Jones JDG und Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444(7117): 323–329
- Jones K und Senft J (1985) An Improved Method to Determine Cell Viability By Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. Journal of Histochemistry & Cytochemistry
- **Joo S, Liu Y, Lueth A** und **Zhang S** (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. Plant Journal **54**(1): 129–140
- Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Abu Qamar S, Mengiste T, Betsuyaku S, Parker JE, Muessig C, Thomma BPHJ, Albrecht C, de Vries SC, Hirt H und Nuernberger T (2007) The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a Brassinoli-independent role in plant cell-death control. Current Biology 17(13): 1116–1122
- Kloek AP, Brooks DM und Kunkel BN (2000) A dsbA mutant of Pseudomonas syringae exhibits reduced virulence and partial impairment of type III secretion. Molecular Plant Pathology 1(2): 139–150

- Knight M, Knight H und Watkins N (1995) Calcium And The Genereation Of Plant Form. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 350(1331): 83–86
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM und Trewavas AJ (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. Nature **352**(6335): 524–526
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N und Yoshioka H (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. Plant Cell **19**(3): 1065–1080
- Koncz C und Shell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Molecular and General Genetics 204(3): 383–396
- Kunert A, Losse J, Gruszin C, Huehn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J und Zipfel PF (2007) Immune evasion of the human pathogen Pseudomonas aeruginosa: Elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. Journal of Immunology 179(5): 2979–2988
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T und Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. Plant Cell 16(12): 3496–3507
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680–685
- Lawton K, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T und Ryals J (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant Journal 10(1): 71–82
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R und Pugin A (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in Nicotiana plumbaginifolia cells. Plant Cell 14(10): 2627–2641
- Lecourieux D, Raneva R und Pugin A (2006) Calcium in plant defencesignalling pathways. New Phytologist 171(2): 249–269
- Lee J, Nam J, Park HC, Na G, Miura K, Jin gBJ, Yoo CY, Baek D, Kim DH, Jeong JC, Kim D, Lee SY, Salt DE, Mengiste T, Gong Q, Ma S, Bohnert HJ, Kwak SS, Bressan RA, Hasegawa PM und Yun DJ (2007) Salicylic acid-mediated innate immunity in Arabidopsis is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. Plant Journal 49(1): 79–90

- Lee J, Rudd J, Macioszek V und Scheel D (2004) Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. Journal of Biological Chemistry 279(21): 22440–22448
- Li AL, Zhu YF, Tan XM, Wang X, Wei B, Guo HZ, Zhang ZL, Chen XB, Zhao GY, Kong XY, Jia JZ und Mao L (2008) Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (Triticum aestivum L.). Plant Molecular Biology **66**(4): 429–443
- Li J, Wen J, Lease K, Doke J, Tax F und Walker J (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. Cell **110**(2): 213–222
- Li X, Song Y, Century K, Straight S, Ronald P, Dong X, Lassner M und Zhang Y (2001) A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. Plant Journal **27**(3): 235–242
- Li Y, Rosso MG, Viehoever P und Weisshaar B (2007) GABI-Kat SimpleSearch: an Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. Nucleic Acids Research **35**: D874–D878
- Liu Y und Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell **16**(12): 3386–3399
- Loake G und Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. Current Opinion In Plant Biology **10**(5): 466–472
- Luan S (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. Trends In Plant Science 14(1): 37–42
- 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. Proc Natl Acad Sci U S A 102(30): 10736–10741
- Ma SY und Wu WH (2007) AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. Plant Molecular Biology **65**(4): 511–518
- Maher E, Bate N, Ni W, Elkind Y, Dixon R und Lamb C (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. Proc Natl Acad Sci U S A 91(16): 7802– 7806
- Mauch-Mani B und Mauch F (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. Current Opinion In Plant Biology 8(4): 409–414
- McAinsh MR und Pittman JK (2009) Shaping the calcium signature. New Phytologist 181(2): 275–294

- McMichael R, Kochansky J, Klein R und Huber S (1995) Characterization of the substrate-specificity of Sucrose-Phosphate Synthase Protein-Kinase. Archives of Biochemistry and Biophysics **321**(1): 71–75
- Medzhitov R und Janeway CAJ (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science **296**(5566): 298–300
- Melotto M, Underwood W und He SY (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. Annual Review of Phytopathology 46: 101–122
- Miles G, Samuel M, Zhang Y und Ellis B (2005) RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. Environmental Pollution 138(2): 230–237
- **Mishina TE** und **Zeier J** (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. Plant Journal **50**(3): 500–513
- Mithofer A, Ebel J, Bhagwat A, Boller T und Neuhaus-Url G (1999) Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with beta-glucan or chitin elicitors. Planta **207**(4): 566–574
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H und Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 104(49): 19613–19618
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriac H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM und Schroeder JI (2006) CD-PKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anionand Ca2+ -permeable channels and stomatal closure. PLoS Biology **4**(10): e327
- Murphy PA, Hendrich S, Landgren C und Bryant CM (2006) Food mycotoxins: An update. Journal of Food Science 71(5): R51–R65
- Nagamune K, Moreno SN, Chini EN und Sibley LD (2008) Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. Subcell Biochem 47: 70–81
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T und Jones J (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. Plant Physiology 135(2): 1113–1128
- Navazio L, Moscatiello R, Genre A, Novero M, Baldan B, Bonfante P und Mariani P (2007) A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. Plant Physiology 144(2): 673–681

- Nühse T, Peck S, Hirt H und Boller T (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. Journal of Biological Chemistry 275(11): 7521–7526
- Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B und Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol Rev **198**: 249–266
- Nürnberger T und Kemmerling B (2006) Receptor protein kinases–pattern recognition receptors in plant immunity. Trends in Plant Science **11**(11): 519–522
- Ogawa N, Yabuta N, Ueno Y und Izui K (1998) Characterization of a maize Ca2+-dependent protein kinase phosphorylating phosphoenolpyruvate carboxylase. Plant and Cell Physiology **39**(10): 1010–1019
- **Oldroyd GED** und **Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annual Review of Plant Biology **59**: 519–546
- **Örke EC** und **Dehen HW** (2004) Safeguard production losses in major crops and the role of crop protection. Crop Protection **23**(4): 275–285
- **Palm NW** und **Medzhitov R** (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunological Reviews **227**(1): 221–233
- Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ und Osbourn AE (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. Proc Natl Acad Sci U S A 96(22): 12923–12928
- **Peck S** (2006) Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. Plant Journal **45**(4): 512–522
- Peiter E, Sun J, Heckmann AB, Venkateshwaran M, Riely BK, Otegui MS, Edwards A, Freshour G, Hahn MG, Cook DR, Sanders D, Oldroyd GED, Downie JA und Ane JM (2007) The Medicago truncatula DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. Plant Physiology 145(1): 192–203
- **Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC** und Nelson RJ (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. Trends In Plant Science 14(1): 21–29
- Ramos HC, Rumbo M und Sirard JC (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends in Microbiology 12(11): 509–517
- Rate D, Cuenca J, Bowman G, Guttman D und Greenberg J (1999) The gainof-function Arabidopsis acd6 mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. Plant Cell **11**(9): 1695–1708
- Ray S, Agarwal P, Arora R, Kapoor S und Tyagi AK (2007) Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (Oryza sativa L. ssp indica). Molecular Genetics and Genomics 278(5): 493–505

- **Reddy A** (2001) Calcium: silver bullet in signaling. Plant Science **160**(3): 381–404
- **Rentel M** und **Knight M** (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. Plant Physiology **135**(3): 1471–1479
- **Robatzek S** (2007) Vesicle trafficking in plant immune responses. Cellular Microbiology **9**(1): 1–8
- **Robatzek S, Chinchilla D** und **Boller T** (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. Genes Dev **20**(5): 537–542
- Romeis T, Ludwig A, Martin R und Jones J (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. EMBO Journal 20(20): 5556–5567
- Romeis T, Piedras P und Jones J (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. Plant Cell 12(5): 803–815
- **Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F** und **Martin GB** (2007) A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. Nature **448**(7151): 370–U13
- Rowland O, Ludwig A, Merrick C, Baillieul F, Tracy F, Durrant W, Fritz-Laylin L, Nekrasov V, Sjolander K, Yoshioka H und Jones J (2005) Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. Plant Cell 17(1): 295–310
- Saha P und Singh M (1995) Characterization Of A Winged Bean (Psophocarpus-Tetragonolobus) Protein-Kinase With Calmodulin-Like Domain - Regulation By Autophosphorylation. Biochemical Journal 305: 205–210
- Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K und Izui K (2000) Over-expression of a single Ca2+-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. Plant Journal **23**(3): 319–327
- Sambrook J und Ruseel DW, Molecular Cloning 2. Ausgabe (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)
- Sanabria N, Goring D, Nuernberger T und Dubery I (2008) Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. New Phytologist **178**(3): 503–513
- Sebastia C, Hardin S, Clouse S, Kieber J und Huber S (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. Archives of Biochemistry and Biophysics **428**(1): 81–91
- Sega G (1984) A Review Of The Genectics-Effects Of Ethyl Methanesulfonate. Mutation Research 134(2-3): 113–142

- Shah J, Kachroo P und Klessig D (1999) The Arabidopsis ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. Plant Cell 11(2): 191–206
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB und Sheen J (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. Cell Host & Microbe 4(1): 17–27
- Shiu SH und Bleecker AB (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. Science STKE 2001(113): RE22
- Smith MFJ, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S und Goldberg JB (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. Journal of Biological Chemistry 278(35): 32552–32560
- Song WY, Zhang ZB, Shao HB, Guo XL, Cao HX, Zhao HB, Fu ZY und Hu XJ (2008) Relationship between calcium decoding elements and plant abioticstress resistance. International Journal of Biological Sciences 4(2): 116–125
- Strange R und Scott P (2005) Plant disease: A threat to global food security. Annual Review of Phytopathology 43: 83–116
- Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su SH, Jester PJ, Zhang S, Bent AF und Krysan PJ (2007) MEKK1 is required for flg22induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. Plant Physiology 143(2): 661–669
- Tang X, Xiao Y und Zhou JM (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions 19(11): 1159–1166
- **Thomma B, Nelissen I, Eggermont K** und **Broekaert W** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus Alternaria brassicicola. Plant Journal **19**(2): 163–171
- **Ton J, Flors V** und **Mauch-Mani B** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. Trends In Plant Science
- **Toutenhoofd S** und **Strehler E** (2000) The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? Cell Calcium **28**(2): 83–96
- **Underwood W, Zhang S** und **He SY** (2007) The Pseudomonas syringae type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in Arabidopsis thaliana. Plant Journal **52**(4): 658–672
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchishinozaki K, Hayashida N und Shinozaki K (1994) 2 genes that encode Ca2+ -dependent Protein-Kinases are

induces by drought and hight-salt stresses in Arabidopsis thaliana. Molecular & General Genetics **244**(4): 331–340

- Vitart V, Christodoulou J, Huang J, Chazin W und Harper J (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**(14): 4004–4011
- **Voinnet O, Rivas S, Mestre P** und **Baulcombe D** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant Journal **33**(5): 949–956
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim Sy, Stacey MG und Stacey G (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. Plant Cell **20**(2): 471–481
- Wanner L, Li G, Ware D, Somssich I und Davis K (1995) The Phenylalanine Ammonia-Lyase gene family in Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology 27(2): 327–338
- Weljie A, Yamniuk A, Yoshino H, Izumi Y und Vogel H (2003) Protein conformational changes studied by diffusion NMR spectroscopy: Application to helix-loop-helix calcium binding proteins. Protein Science 12(2): 228–236
- Wildermuth M, Dewdney J, Wu G und Ausubel F (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature 414(6863): 562–565
- Witte CP, Noel LD, Gielbert J, Parker JE und Romeis T (2004) Rapid onestep protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. Plant Molecular Biology 55(1): 135–147
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J und Zhou JM (2008) Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. Current Biology 18(1): 74–80
- Yang T und Poovaiah B (2002) A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. Journal of Biological Chemistry 277(47): 45049–45058
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS und Schroeder JI (2008) Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. Plant Methods 4
- Yano K, Yoshida S, Mueller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang TL, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M und Parniske M (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. Proc Natl Acad Sci U S A 105(51): 20540–20545

- Yoo B und Harmon A (1996) Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochemistry 35(37): 12029–12037
- **Yoo SD**, **Cho YH** und **Sheen J** (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nature Protocols 2(7): 1565–1572
- Yoshioka K, Moeder W, Kang H, Kachroo P, Masmoudi K, Berkowitz G und Klessig D (2006) The chimeric Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses. Plant Cell 18(3): 747–763
- Zeng L, Vega-Sanchez M, Zhu T und Wang G (2006) Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. Cell Research 16(5): 413–426
- Zhang X und Chollet R (1997) Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a Ca2+-dependent protein kinase. FEBS Letters 410(2-3): 126–130
- Zhang Z, Feechan A, Pedersen C, Newman MA, Qiu Jl, Olesen KL und Thordal-Christensen H (2007) A SNARE-protein has opposing functions in penetration resistance and defence signalling pathways. Plant Journal 49(2): 302–312
- **Zhao S** und **Qi X** (2008) Signaling in plant disease resistance and symbiosis. Journal of Integrative Plant Biology **50**(7): 799–807
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, Xu YH, Zhang XY und Zhang DP (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. Plant Cell 19(10): 3019–3036
- Zierold U, Scholz U und Schweizer P (2005) Transcriptome analysis of mlomediated resistance in the epidermis of barley. Molecular Plant Pathology 6(2): 139-151
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L und Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiology **136**(1): 2621–2632
- **Zipfel C** (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Current Opinion in Immunology **20**(1): 10–16
- **Zipfel C** und **Felix G** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? Current Opinion In Plant Biology **8**(4): 353–360
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T und Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. Cell **125**(4): 749–760

**Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley E, Jones J, Felix G** und **Boller T** (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. Nature **428**(6984): 764–767

# 5 Anhang

|      |     | Variable-Domäne  |      |
|------|-----|--|------|
| CPK5 | CDS | MGNSCRGSFKDKLDEGDNNKPEDYSKTSTTNLSSNSDHSPNAADIIAQEFSKDNNSNNNS   | 178  |
| CPK6 | CDS | MGNSCRGSFKDKIYEGNHSRPEENSKSTTTTVSSVHSPTTDQDFSKQNTN-  | 148  |
|      |     | Variable-Domäne Kinase-Domäne  |      |
| СРК5 | CDS | KDPALVIPLREPIMRRNPDNQAYYVLGHKTPNIRDIYTLSRKLGQGQFGTTYLCTEIASG   | 358  |
| CPK6 | CDS | PALVIP <mark>VK</mark> EPIMRRN <mark>V</mark> DNQ <mark>S</mark> YYVLGHKTPNIRD <mark>I</mark> YTLSRKLGQGQFGTTYLCT <mark>D</mark> IA <mark>I</mark> G | 322  |
|      |     | Kinase-Domäne  |      |
| СРК5 | CDS | VDYACKSISKRKLISKEDVEDVRREIQIMHHLAGHGSIVTIKGAYEDSLYVHIVMELCAG   | 538  |
| CPK6 | CDS | VDYACKSISKRKLISKEDVEDVRREIQIMHHLAGH <mark>KN</mark> IVTIKGAYED <mark>P</mark> LYVHIVMELCAG   | 502  |
|      |     | Kinase-Domäne  |      |
| СРК5 | CDS | GELFDRIIQRGHYSERKAAELTKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDDFSLKA   | 718  |
| CPK6 | CDS | GELFDRII <mark>H</mark> RGHYSERKAAELTKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDDFSLKA  | 682  |
|      |     | Kinase-Domäne  |      |
| CPK5 | CDS | IDFGLSVFFKPGQIFTDVVGSPYYVAPEVLLKRYGPEADVWTAGVILYILLSGVPPFWAE   | 898  |
| CPK6 | CDS | IDFGLSVFFKPGQIF <mark>K</mark> DVVGSPYYVAPEVLLK <mark>H</mark> YGPEADVWTAGVILYILLSGVPPFWAE   | 862  |
|      |     | Kinase-Domäne  |      |
| CPK5 | CDS | TQQGIFDAVLKGYIDFESDPWPVISDSAKDLIRRMLSSKPAERLTAHEVLRHPWICENGV   | 1078 |
| CPK6 | CDS | TQQG1FDAVLKGY1DFD1DPwPV1SDSAKDL1RKMLCSSPSERLTAHEVLRHPW1CENGV   | 1042 |
|      |     | Verbindungs-Domäne Calmodulin-ähnliche Domäne  |      |
| CPK5 | CDS | APDRALDPAVLSRLKQFSAMNKLKKMALKVIAESLSEEEIAGLREMFQAMDTDNSGAITF   | 1258 |
| CPK6 | CDS | APDRALDPAVLSRLKQFSAMNKLKKMALKVIAESLSEEEIAGLRAMPEAMDTDNSGAITF   | 1222 |
|      |     | Calmodulin-ähnliche Domäne   |      |
| CPK5 | CDS | DELKAGLRKYGSTLKDTEIHDLMDAADVDNSGTIDYSEFIAATIHLNKLEREEHLVAAFO   | 1438 |
| CPK6 | CDS | DELKAGLERRYGSTLKDTETROLMBAADVDNSGTIDYSEFLAATIHLNKLEREEHLVSAFQ  | 1402 |
|      |     | Calmodulin-ähnliche Domäne   |      |
| CPK5 | CDS | YFDKDGSGFITIDELQQACVEHGMADVFLEDIIKEVDQNNDGKIDYGEFVEMMQKGNAGV   | 1618 |
| CPK6 | CDS | YFDKDGSGYITTIDELQQSCLEHGHIDVFLEDIIKEVDQDNDGRLDYEEFVAMMQKGNAGV  | 1285 |
|      |     |  |      |
| CPK5 | CDS | GRRTMRNSLNISMRDA.  | 1669 |
| CPK6 | CDS |  | 1033 |



Abbildung 5.2 Genomische Sequenz von At4g35310 (*AtCPK5*): schwarz: Promoter; rot: 5'und 3'- UTR; blau: Introns; gelb: Exons

aacccaaaatataattttgcttgtgtacgtggaggtgtcaaatttgattcagtcttgtgaaaatgt ${\tt atgttatcattttaggccttattgtaaggtctaaagtctaaaacaatacaataatacggcctttgg$ ggtgtctgaattttgtatttgaacattgggctggatcagtgaataaacaaggcccaaaagtaaaac ttattagggattatgtgcggggctccagaaagttgcaatatatggaaaagtcaatctcttacgtca  ${\tt taatagtcagtgacgccataatactgtttaaatatttggcatatctttatcttaagaaaaaatctcaa}$ qaqattactattctttctqataqqaqattqaatqaacqqttqcttcttttacaaqtaqatcacatq tatttaaattagtcttctcatacgacgagaataaaaccatcgtgcttaatacttaaatttttttac aattaacggtaactagtaaaaccagaaatgcattttgattttgtacaaaccaacattctaattttagt tttttttttcaattacaatttaaacgataaacaaaagagaaactggtttaaatttaataatgcaaa aqcaqaaqaaagaaggtgagaggaaacagcggagagagagagagtcagaggtgtagaagtagta gctggtgagcactaataaaagacctttcttcgctcaatcgccgccgtaaaataaaacaccatcacatt ctcatccaacgaatctaatctatccgaccaaaaccaaagctcttaaaaaaatctatttttattcttac ttcaatctctgaaataaataaacataaaatattgtagctttcctttgttgttcgacttttctttt ctttcqcccttctqaqttcaacaactqqtaactaqatcctctttttqctttacttcattctctqtt tctttgatctgatgtgggtttttgcgtctttctttacttgtggtattgttaaagttcgttactttgttc tcgtttagcttcttgtatttggtctaatttaagtcttttgacttttgacagtgttatctctatgaa cagttcctttgatgaagaacacaaagtgaaagttgctgtctttataaccaggatttggtaattccc attgtttc<mark>ATC</mark>GGCAATTCTTGCCGTGGATCTTTCAAGGACAAACTCGACGAAGGCGATAACAATAAG **CCTGAAGATTACTCTAAAAACCTCTACCACCAACTTGTCTTCTAATTCCGACCATTCACCGAACGCT** GCAGACATCATTGCTCAAGAATTCTCCAAAGACAACAACAACAACAACAACAAGAAGATCCAGCT CTTGTTATTCCTTTAAGAGAACCAATCATGAGGCGTAACCCAGACAATCAAGCTTACTATGTTCTTGG TCATAAGACACCAAACATTCGTGATATCTATACCCTTAGCCGCAAGCTAGGTCAAGGTCAATTTGG AACGACTTATCTATGTACAGAGATTGCCTCAGGCGTTGACTACGCTTGTAAGTCAATATCCAAGAG GAAGTTGATCTCTAAAGAAGATGTTGAGGATGTTAGAAGGGAGATTCAGATAATGCATCATTTAGCTG GTCACGGTAGTATCGTGACGATTAAAGGAGCTTATGAGGACTCTTTGTATGTTCACATTGTTATGG AGCTTTGTGCTGGAGGTGAATTGTTTGATAGGATTATTCAGAGAGGACATTATAGTGAGAGGAAAG CTGCTGAGCTGACTAAGATCATTGTCGGTGTTGTTGAAGCGTGTCATTCGCTTGGTGTGATGCATAGA TTTGGGCTATCTGTCTTTTTCAAACCAGgtaaagtgtttgaagcttttagttaatgttttgcttaa  $ctaggctggtaaaagaatcttatgaaacagaatgtgactttcag {\tt GTCAAATATTCACTGATGTTGTTG}$ GAAGTCCATATTATGTTGCTCCTGAGGTTTTGCTCAAACGTTATGGGCCTGAAGCTGATGTGTGGA CTGCTGGTGTTATATTGTATATTGCTAAGCGGAGTCCCACCTTTCTGGGCAGqtatttqtcatt ttccatgttagcctgtttcttagtcatgtagaaagtctaagtcacctgaaatgtgttttgtattgtcg tttttggaatcagAAACACAGCAAGGGATATTTGATGCTGTGTGAAAGGATATATCGACTTTGAG TCAGAČČCGTGGČCTGTGATATCCGACAGTGCTAAAGACTTGATCCGCAGAATGTTATCCTCCAAG **CCTGCAGAACGTTTGACCGCTCATGAAGTCTTGC**gtacgtattcacataaatgattacttatagtgac aaccaaacagcattagactaatatccttttttcagGTCATCCATGGATCTGTGAGAATGGTGTTGC ACCAGATAGĂGCACTĂGATCCAGCTGTTCTTTCTĆGTCTCAAGCAATTCTCTGCAATGAATAAACT AAAGAAGATGGCTTTGAAGgtgagtgattttgtgcgtaaaccctttatcttctttggtctctgcatca  $\verb+cttctcatgaaactgtttgttttactctttgttttgggctcatcagg{\tt GTTATAGCTGAGAGTCTCTC}$ GGAAGAAGAGATAGCTGGTTTAAGAGAAATGTTTCÄÄGCAATGGATACTGATAACAGCGGGGGCAAT CACATTTGATGAACTCAAAGCTGGGCTGAGAAAATATGGATCTACCTTGAAAGACACAGAGATCCATG **ATCTTATGGATGCG**gtaaaaatctaaccttatttggttaagtacattgacaatgaagtattgttat gtattcttacactcagctcttttattgaccagGCTGATGTAGACAACAGTGGGACAATAGATTACA **GTGAGTTCATTGCAGCGACGATCCATCTCAACAAACTAGAGCGGGAAGAGCATCTTGTTGCAGCGTTT** CAATATTTTGACAAAGATGGAAGCGGTTTCATAACAATTGATGAGCTACAACAAGCGTGTGTTGAA CATGGCATGGCTGATGTTTTCCTTGAAGACATCATCAAAGAAGTTGATCAAAACAATgtaagctta tatgatgatctgttccacattcctcgctaggctaatgtcgaggcatcagctgataaaaagtcttatcg ĞGGAAATGCTGĞTGTTĞGAAGAAGAAGACGATGAGAAATAGTCTAAACATTAGCATGAGAGACGCG**T**A eaggttgttttcccccggtgttttaatatgttagtgcgatcgtgactgcgaaaatgttcttattcatgga atcaaccaacctcaatgctcaccacctagaaggcgatgaaagaagaccaaaccggattcatacctgt ggatggttcgagttttgtttaacgactgtgtgattaatcgtcaagtagtttttggaggttttttctt tacctctttgttgtttgttcattatggccattgttgaagttagtgagctttgttcatcatctgccattgttaaactttgttcacttgtatttgaaaaaaacaaaatgtctttgtatgttgtgtgatttctaag catttttactttgaaaatctatttcttcttttct

Abbildung 5.3 Genomische Sequenz von At2g17290 (*AtCPK6*): schwarz: Promoter; rot: 5'und 3'- UTR; blau: Introns; gelb: Exons

cttttaaaqaacactcqacaatqtaaaatttaaaqtaqqtctaqcttcttatccqtttaaqaqaac gatttttttttttaaatgatatgattcacggtttgtaaagttatctattggaaaataaaaaaactg taagtacaatactgtgatgtcaaaaagaaaaaaaagtacacccaaactaaatttgtaccacgtgc gagacaaattgtagtctgcgatcttactcactacccgacaatgacatgccccatgccttagttcttgtaagaaaaaagtgatatcctatatacttcactaattattggtaaaattatqcaaaactttcaqtq ctaaaagtttgatttatactgtactagttgttatttcaacgtagacataccaaaatgtttattcaagaaagcctatatactagcaaaagtaaaaaagaatgtgacatctttgatgaaccaatgtgaaaagtcaacataataaaacttqaqttttcaqaacaaatttaqttqtccattqtttcqatctqttaatcaaqa ccataaattaactcttaactatatgcatctaataataatattttgtagttagctaagttaagcacatccaactcttaaaaaaagctagtataacgttaggcttataatcattctcttaataataagttatcc taaacaaattattgcaattttttattctccctacttgcactaagtatcattacaccagtaaaagatgatgatcccttaaattaatactaattaaacaagcaattaaggaatgaagaaggtgagacgaaaccg cgtaaaagacctttcttcttcgcaccatcctctctccttcatcatttcacaaaatccacaaaagaat ${\tt caatcttttt}aacactctctaatgattcaacgaatccaattacccaaccagaaacagcaacacata$ tagagatatatactattaaacaataacataacaaagaaaccatttttttctcttttgttattgactt aaacaaaaactatcaacgaataattatccttttttgagttttttcccatttcttcttcgtctccatttcatcgtcttctcgctgttctgctatattcccggtactagatcctctgttttctcatgtttctttta  ${\tt ttaccaaatgatttcttcatttattgttgtgtctttgattcttttttgggatctataatgatcgat}$ aaaacaattatgttttttgaagcttgatctgatgtgggttctttgatttcgttccaaagtttgata  $gaggagaagaagaagtgaaaaagttgtgaaatagagagagtttgtttc \\ \underline{ATG} \underline{GGCAATTCATGTC} \\ \underline{ATG} \underline{GGCAATTC} \\ \underline{ATG} \underline{GGCATTC} \\ \underline{ATG} \underline{GGCATTC} \\ \underline{ATG} \underline{GGCATTC}$ ĞTĞĞTŤĊTŤTTĂAĞĞĂĊĂAAATĊTĂĊĞĂĞĞĞCAATĊATAĞTĂĞĞĊĊĊĞAĞĞAĞAATTĊĊAAATĊĊA CCACCACTACTGTTTCCTCTGTTCATTCTCCTACTACAGACCAAGATTTCTCCCAAACAGAACACCA ATGTTCTTGGTCACAAGACTCCTAACATTCGTGATCTTTACACGTTGAGTCGTAAGTTAGGACAAG GACAATTCGGGACAACGTATTTGTGTACTGATATTGCCACAGGTGTTGACTATGCTTGTAAGTCTA ATCATTTAGCTGGTCACAAGAATATTGTTACTATTAAAGGAGCTTATGAGGATCCTTTGTATGTTC ACATTGTGATGGAGCTTTGTGCTGGTGGTGAGTTGTTTGATAGGATTATTCATAGAGGTCATTACA GCGAGAGAAAGCTGCTGAGTTGACCAAGATCATTGTCGGTGTTGTTGAGGCGTGTCATTCTCTTG GTGTTATGCATAGAGATTTAAAGCCTGAGAATTTCTTGTTGGTTAATAAGGATGATGATTTCTCTC **TTAAGGCCATTGATTTTGGTCTCTCTGTTTTCTTCAAACCAGgtaagcgttagttgcgagtttctc** attgttctgaatctatttaagtaccatgatgtgttttgtagtatacattactgtgactttctattcGCCAAATATTCAAGGATGTTGTTGGAAGTCCATACTATGTTGCTCCTGAGGTTCTTCTAAAACATT ATGGTCCAGAAGCTGATGTGTGGACTGCTGGTGTTATACTCTATATCTTACTAAGTGGTGTCCCGC **CTTTCTGGGCAG**qtatqcqggcqatataqctqtttcaatqcqttctcttaattaqtqccattqaca aggtttcctgaagtttggttttgtgtttttgaaatcagAAACACAGCAAGGAATATTTGATGCTGT GTTGAAGGGATATATTGACTTTGATACAGACCCGTGGCCTGTCATATCCGACAGTGCTAAAGATCT GATCCGGAAGATGTTATGCTCTAGTCCTTCTGAACGTTTGACTGCTCATGAAGTCTTGCgtacgta  $at {\tt caatta} a {\tt caatta} a {\tt at catttggc} a {\tt gc} a {\tt cacta} a {\tt catta} a {\tt catttgt} a {\tt cattdg} a {\tt catta} a {\tt catttgt} a {\tt cattdg} a$ gtatctcttttttttcagGTCATCCATGGATCTGTGAGAATGGAGTTGCACCGGATAGAGCACTT GACCCGGCTGTTTTGTCTCGTCTAAAACAGTTTTCTGCAATGAATAAATTAAAGAAGATGGCTTTA AAGgtcagtttgtagttatactcaatcttctattgtctctgcatcacattcgtttgagatatgttt actcatattagtgattatggaatgatcagGTGATAGCTGAGAGCCTCTCAGAAGAAGAAGAAGATTGCGG GTTTAAGAGCAATGTTTGAGGCAATGGATACTGATAACAGCGGTGCAATCACTTTTGATGAACTCA AAGCTGGCTTGAGAAGATATGGATCAACCTTGAAAGACACCGAGATCCGAGATCTTATGGAAGCGg taacaatgcatccttttgagatatgcacactagttcatttcgctatatagatgacaataaccatac tctctqtqttqtatcttaqGCTGATGTGGACAACAGCGGTACAATAGATTACAGCGAGTTTATTGC AGCGAČGATCČATCTGAATAAACTAGAGAGAGAGAGAGCATCTTGTCTCTGCATTTCAGTACTTTGA CAAAGATGGAAGTGGTTACATCACCATTGATGAGCTGCAACAATCTTGCATTGAACATGGGATGAC  ${\tt CGATGTTTTCTTGAAGACATAATCAAAGAAGTAGATCAAGACAACgtaagctttgcctcttgaca}$ tqattcttccactcttcaccattqqtqtttqctaataaaqttttqqtttttqtttcttacaqGATG GĂCGGATTGATTACGAAGAATTTĞTTĞCGATGATGCAAAAGGGAAATGCTGĞTGTAGGGAGAAGAA CAATGAAAAATAGTCTAAACATCAGCATGAGAGATGTG TAG g cacatacacatctttaaatcgtctattcggtgaggatgcaaatgtttccatggaatcaacatttgcaatgtttaatcacagaggagga agagaaaccagattcatagctgcagcgaaccagctaaatcgttgaaggtttgagttaaaaatgtta gtttttatttcatctccatcgtcgaaagctttgaccctttttggggtttttgaaagatcaaatcatc ttccaatatagtacaaatgtgatatacaagttgtgtgac

|                | ~   |         |       |
|----------------|---|---------|-------|
| Primername     | Sequenz   | Beschre | ibung |
| cpk5-mut frw   | 5'-TGGTGTGATGCATAGAGCCTTGAAGCC-                             | D221A   | Aus-  |
| -              | TGAGAATTT-3′  | tausch  |       |
| cpk5-mut rev   | 5'-AAATTCTCAGGCTTCAAG G CTCTATGC-                           | D221A   | Aus-  |
|                | ATCACACCA-3′  | tausch  |       |
| cpk6-mut frw   | 5′-TGGTGTTATGCATAGAGCTTTAAAGCC-                             | D209A   | Aus-  |
|                | TGAGAATTT -3′   | tausch  |       |
| cpk6-mut rev   | 5´-AAATTCTCAGGCTTTAAA G CTCTAT-                             | D209A   | Aus-  |
|                | GCATAACACCA-3´  | tausch  |       |
| S8A frw        | 5´-CTTGCCGTGGA <mark>G</mark> CTTTCAAGGACA-                 | S8A     | Aus-  |
|                | AACTCG-3′   | tausch  |       |
| S8A rev        | 5´-CGAGTTTGTCCTTGAAAG <mark>C</mark> TCCACG-                | S8A     | Aus-  |
|                | GCAAG-3´  | tausch  |       |
| S8D frw        | 5´-CTTGCCGTGGAG <mark>A</mark> TTTCAAGGACAA-                | S8D     | Aus-  |
|                | ACTCG-3´  | tausch  |       |
| S8D rev        | 5'-CGAGTTTGTCCTTGAAA T CTCCACGGC-                           | S8D     | Aus-  |
|                | AAG-3´  | tausch  |       |
| T98A/S100A frw | 5´-GTGATATCTAT <mark>G</mark> CCCTT <mark>GC</mark> CCGCA-  | T98A/S  | 100A  |
|                | AGCTAG-3′   | Austaus | ch    |
| T98A/S100A rev | 5´-CTAGCTTGCGG <mark>GC</mark> AAGGG <mark>C</mark> ATAGAT- | T98A/S  | 100A  |
|                | ATCAC-3′  | Austaus | ch    |

Tabelle 5.2 Mutageneseprimer: Die roten Boxen markieren die mutierten Basen

### Tabelle 5.1 Primer zur Genotypisierung

| Primername | Sequenz                        | Beschreibung     |
|------------|--------------------------------|------------------|
| cpk6 5A    | 5'-ATCGTCTTCTCGCTGTTCTGCTAT-3' | CPK6 5´-Primer   |
| cpk6 3A    | 5'-TTTCCTCTCGCTGTAATGACCTCT-3' | CPK6 3'-Primer   |
| bak1-3 frw | 5'-CCTATTCCATCAACTCTCGG-3'     | Bak1-3 5'-Primer |
| bak1-3 rev | 5'-CATCAAAGAAGTGGTCCTGCGGC-3'  | Bak1-3 3'-Primer |
| fls2 frw   | 5'-TGTTGTCCGGTGATGTTCCTG-3'    | Fls2 5'-Primer   |
| fls2 rev   | 5´-CGGTGAAATGATTCCTCCCAA-3´    | Fls2 3'-Primer   |
| lba        | 5'- TGGTTCACGTAGTGGGCCATC-3'   | SALK-lba         |

| Primername       | Sequenz   | Beschreibung          |            |  |
|------------------|---|-----------------------|------------|--|
| cpk5 FL frw      | 5'-caccATGGGCAATTCTTGCCGTG-3'   | cpk5 5´-FL            |            |  |
|                  |   | Primer                |            |  |
| cpk5 FL rev      | 5'-CGCGTCTCTCATGCTAATG-3'   | cpk5 3´-FL            |            |  |
|                  |   | Primer                |            |  |
| cpk5 VK frw      | 5'-caccATGGGCAATTCTTGCCGTG-3'   | cpk5 5´-VK            |            |  |
|                  |   |                       |            |  |
| cpk5 VK rev      | 5'-AACACCATTCTCACAGATCCATG-3'   | cpk5 3                | -VK        |  |
|                  |   | Primer                |            |  |
| cpk6 FL frw      | 5'-caccATGGGCAATTCATGTCGTG-3' cpk6 5'-FL  |                       | -FL        |  |
|                  | 5'-CACATCTCTCATGCTGATGTTTAG-3'  |                       | cpk6 3'-FL |  |
| срко FL rev      |   |                       |            |  |
| onkh VK fra      |   | Primer                |            |  |
| срко ук ни       | 5 -tacchiolocchai tearoiteoro-5   | Drimer                | - v K      |  |
| cnk6 VK rev      | 5′-A ACTCC ATTCTC AC AG ATCC ATG-3′   | cnk6 3'-VK            |            |  |
| epico viriev     |   | Primer                | V IX       |  |
|                  |   | 1.5                   |            |  |
| CPK5 PrF-Asci    | 5 -ggcgcgccAAACCAAGTIGGAGAGAIG-   | сркэ<br>5 ( Duinu     | Promoter   |  |
| ants Dr D EacDI  | $\begin{array}{c} 1 \text{ IACAG-} \\ 5' \text{ another CAAACAATCCCAATTACCAAA} \end{array}$ | 5 -PTIII              | Duomotou   |  |
| сркэ РГК-Есокі   | J -gaallCOAAACAATGOGAATTACCAAA-   | CPKS                  | Promoter   |  |
| onk6 DrE Asol    | 1C-5<br>5′ ggegegeeCTTTTAAAGAACACTCGAC  | ork6                  | Dromoter   |  |
| epko I II - Asei | $\Delta \Delta TG_{-3'}$  | 5'-Prim               | i ioniotoi |  |
| cpk6 PrR-EcoRI   | 5'-gaatteGAAACAAACTCTCTCTATTTC-   | $\frac{5 - 1}{2}$ mk6 | Promoter   |  |
| CPRO I IN LCOM   | ACAAC-3   | 3'-Primer             |            |  |
|                  |   | e i iiii              |            |  |

Tabelle 5.3 Klonierungsprimer

| Primername   | Sequenz                          | Beschreibung     |
|--------------|----------------------------------|------------------|
| ckp5 scr frw | 5'-AGCGTGTGTTGAACATGGCATGG-3'    | CPK5 5'-Primer   |
| cpk5 scr rev | 5'-CTACTTGACGATTAATCACACAGTCG-3' | CPK5 3'-Primer   |
| yfp rev      | 5'-ACGCCGTAGCCGAAGGTGGTC-3'      | yfp 3´-Primer    |
| cpk6 5A      | 5'-ATCGTCTTCTCGCTGTTCTGCTAT-3'   | CPK6 5'-Primer   |
| cpk6 3A      | 5'-TTTCCTCTCGCTGTAATGACCTCT-3'   | CPK6 3'-Primer   |
| actin2 frw   | 5'-GTGAACGATTCCTGGACCTGCCTC-3'   | Actin2 5'-Primer |
| actin2 rev   | 5'-GAGAGGTTACATGTTCACCACAAC-3'   | Actin2 3'-Primer |
| frk1 frw     | 5'-TGCAGCGCAAGGACTAGAG-3'        | Frk1 5´-Primer   |
| frk1 rev     | 5'-ATCTTCGCTTGGAGCTTCTC-3'       | Frk1 3'-Primer   |
| pr1 frw      | 5'-CTCAAGATAGCCCACAAGATTATC-3'   | Pr1 5´-primer    |
| pr1 rev      | 5'-CTCGTTCACATAATTCCCACGAGG-3'   | Pr1 3'-Primer    |
| pr4 frw      | 5'-ATGAAGATCAGACTTAGCATAAC-3'    | Pr4 5'-Primer    |
| pr4 rev      | 5'-GGAGCAATAAGCACTCACGGCTC-3'    | Pr4 3'-Primer    |
| ics1 frw     | 5'-CTCCCGCAAGAAGTATGAGTC-3'      | ICS1 5'-Primer   |
| ics1 rev     | 5'-GTTCCCATTCAACAGCGATC-3'       | ICS1 3'-Primer   |
| vsp2 frw     | 5'-CCGCTACGGTCTCGGCATCCGTT-3'    | Vsp2 5´-Primer   |
| vsp2 rev     | 5´-GGGAATACTAGAGAGGAGGGTAT-3´    | Vsp2 3´-Primer   |
| lox3 frw     | 5'-CAGAAAGGTCATCACTTGTCTCG-3'    | Lox3 5'-Primer   |
| loc3 rev     | 5'-GGATCAAGTTGGGTGCTGATAAGC-3'   | Lox3 3'-Primer   |

### Tabelle 5.4 Primer für RT-PCR-Analysen



Abbildung 5.4 pXCSG-StrepII-Vektoren



Abbildung 5.5 pXCSG-YFP-Vektoren



Abbildung 5.6 pXCSG-GUS-Vektoren

## Lebenslauf

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

### Poster und Präsentationen

### 2006

3. International Symposium: Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism, Potsdam Poster: Characterization of the Arabidopsis CDPK Gene Family

3. Tri-National Arabidopsis Meeting, Tübingen
Poster: Characterization of the Arabidopsis CDPK gene family: substrate specificity and function in primary metabolism?
Posterpreis in der Kategorie Signaltransduktion

XVII. Havel-Spree Kolloquium, MPIMP Golm Vortrag: Characterization of the Arabidopsis CDPK gene family: substrate specificity and function in primary metabolism?

### 2007

3. International Rauischholzhausen Conference, Gießen Poster: Function of Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPK) in plant defence

XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento Poster: Function of CDPKs during the onset of early plant defense responses

#### 2008

5. Tri-National Arabidopsis Meeting, Zürich Poster: Function of *At*CPK5/*At*CPK6 during the onset of early plant defense

Colloquium Schwerpunktprogramm 1212 der DFG: Microbial Reprogramming of Plant Cell Development, Bad Honnef

Vortrag: Function of CDPK activation, localization and interaction with regulatory proteins during the induction of plant defence responses

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denjenigen zu Danken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Tina Romeis für die Überlassung dieses interessanten Themas, Ihre stete Bereitschaft zur Diskussion, das von Ihr in mich gesetzte Vertrauen auch mal eigene Wege gehen zu können und dafür meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen präsentieren zu dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Romeis für die interessante Zeit mit all ihren Höhen und Tiefen, und ich hoffe die Computer mögen es mir verzeihen, wenn ich das Labor mal verlasse.

Ich danke Eva Reimer für die große Unterstützung bei der Analyse der Phosphorylierungen und allen anderen Studierenden, die ich während dieser Zeit betreuen durfte, für ihren gezeigten Einsatz.

Ich danke all den Leuten der FG Nürnberger des Instituts für Pflanzenbiochemie der Uni Tübingen für die weiterhin bestehenden guten Kontakte, die immer wieder spannenden Diskussion auf diversen Konferenzen und für die Bereitstellung diverser Pflanzenlinien und Pathogenen. Insbesondere möchte ich Dr. Fréderic Brunner danken, der mir sehr dabei geholfen hat die zahlreichen Probleme bei der Etablierung der transienten Proteinexpression in Mesophyll-Protoplasten zu lösen.

Ich danke der Abteilung Zelluläre Signaltransduktion des Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) für die Synthese der Flg22 und Elf18 Peptide und insbesondere Stefanie Ranf für die Durchführung der Aequorin-Messungen.

Ich danke der AG Schulze am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm für die schnelle Messung und Identifikation der Phosphopeptide.

Ganz besonders Danken möchte ich meiner Familie. Ohne Eure Unterstützung wäre es nie zu alldem hier gekommen.