

**Charakterisierung der
calcium-abhängigen Proteinkinase
CPK28 aus *Arabidopsis thaliana*
als Regulator der Sprosselongation
und der vaskulären Entwicklung**

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

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

vorgelegt von

Susanne Matschi

aus Augsburg

2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2008 bis Februar 2013 an der Freien Universität Berlin, Abteilung Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von Prof. Dr. Tina Romeis durchgeführt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Tina Romeis

2. Gutachterin: Prof. Dr. Margarete Baier

Disputation am: 10.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung / Summary	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Signaltransduktion in Pflanzen – Calcium als sekundärer Botenstoff.....	1
1.2. Calcium-abhängige Proteinkinasen.....	1
1.2.1. Modularer Aufbau der CDPKs.....	2
1.2.2. Biochemische Aktivierung der CDPKs.....	2
1.2.2.1. Aktivierung durch Calcium-Bindung.....	3
1.2.2.2. Aktivierung durch Trans- bzw. Auto-Phosphorylierung.....	3
1.2.3. Die CPK-Proteinfamilie in <i>Arabidopsis</i>	4
1.2.4. Biologische Funktionen von CDPKs.....	5
1.2.5. Entwicklungsspezifische CDPKs.....	6
1.3. Interaktionsstudien mit CPK28: potentielle Interaktoren.....	7
1.4. Der Entwicklungszyklus von <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
1.4.1 Der reproduktive Phasenwechsel.....	8
1.4.2. Wachstum in der reproduktiven Phase.....	9
1.4.3. Sekundäres Dickenwachstum.....	10
1.4.3.1. Etablierung des sekundären Dickenwachstums.....	10
1.4.3.2. Sekundäre Zellwandbiosynthese.....	11
1.4.4. Regulatoren der Pflanzenentwicklung.....	12
1.4.4.1. Licht.....	12
1.4.4.1.1. Lichtperzeption und Signaltransduktion.....	13
1.4.4.1.2. Lichtabhängige Elongationsprozesse.....	14
1.4.4.2. Entwicklungsspezifische Phytohormone.....	15
1.4.4.2.1. Gibberellinsäure.....	16
1.4.4.2.2. Jasmonate.....	18
1.4.4.2.3. Die GA-JA-Balance – Wachstum oder Verteidigung?....	21
1.4.5. Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Material.....	24
2.1.1. Pflanzenmaterial.....	24
2.1.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.1.1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	25
2.1.2. Bakterienstämme.....	26
2.1.3. Vektoren.....	26
2.1.3.1. Ausgangsvektoren.....	26
2.1.3.2. Verwendete Vektoren.....	27
2.1.4. Chemikalien.....	29
2.1.5. Nährmedien.....	30
2.1.6. Verwendete Computerprogramme.....	30
2.2. Methoden.....	31
2.2.1. Mikrobiologische Methoden.....	31
2.2.1.1. Anzucht von <i>E. coli</i>	31

2.2.1.2. Hitzeschocktransformation chemokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	31
2.2.1.3. Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	31
2.2.1.4. Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
2.2.1.5. Elektroporation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.2.1.6. Herstellung chemokompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> - Zellen.....	32
2.2.1.7. Herstellung von Glycerinkulturen.....	32
2.2.2. Molekularbiologische Methoden – Nukleinsäuren.....	32
2.2.2.1. <i>E.coli</i> -Plasmid-DNA-Präparation.....	32
2.2.2.2. DNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i> nach Edwards <i>et al.</i> (1991).....	32
2.2.2.3. RNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i> nach Chomczynski und Sacchi (2006)	33
2.2.2.4. DNase-Behandlung der RNA.....	33
2.2.2.5. Überprüfung der RNA-Reinheit mit <i>realtime</i> -PCR (nur für qRT- PCR)	33
2.2.2.6. cDNA-Synthese.....	34
2.2.2.7. <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)...	34
2.2.2.8. quantitative <i>realtime</i> -PCR (qRT-PCR).....	34
2.2.2.9. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) nach Mullis <i>et al.</i> (1986).....	35
2.2.2.10. Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.2.2.11. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	36
2.2.2.12. Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration.....	36
2.2.3. Klonierung.....	36
2.2.3.1. Restriktionsverdau von Plasmiden.....	38
2.2.3.2. Dephosphorylierung.....	38
2.2.3.3. Ligation.....	38
2.2.3.4. Gateway®-Klonierung.....	38
2.2.3.5. Mutagenese-PCR nach Weiner <i>et al.</i> (1994).....	39
2.2.3.6. Sequenzierung der DNA.....	39
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.2.4.1. Proteinbiochemie – <i>E. coli</i>	39
2.2.4.1.1. Proteinexpression in <i>E. coli</i> unter Verwendung eines IPTG-induzierbaren Systems.....	39
2.2.4.1.2. Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	40
2.2.4.1.3. GST-Aufreinigung.....	40
2.2.4.2. Proteinbiochemie – Pflanzen.....	40
2.2.4.2.1. Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> -Blättern.....	40
2.2.4.2.2. Transiente Expression in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten.....	41
2.2.4.2.3. Proteinextraktion nach transienter Expression in <i>N. benthamiana</i>	42
2.2.4.2.4. Proteinextraktion nach transienter Expression in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten.....	42
2.2.4.2.5. Proteinextraktion stabil-transformierter <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> -Pflanzen.....	42
2.2.4.2.6. StrepII-Affinitätschromatografie.....	42
2.2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
2.2.4.4. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)..	43
2.2.4.5. Coomassie-Färbung.....	44

2.2.4.6. Western Blot.....	44
2.2.4.7. Färbung von Membranen mit Ponceau-S.....	44
2.2.4.8. Immunodetektion.....	44
2.2.4.9. Massenspektrometrische Untersuchung der <i>in vivo</i> - Phosphorylierung.....	45
2.2.4.10. Bestimmung des Anthocyangehalts.....	45
2.2.4.11. Bestimmung des Ligningehalts.....	46
2.2.5. Enzymaktivitätsmessungen.....	46
2.2.5.1 <i>in vitro</i> -Kinaseaktivitätsmessung.....	46
2.2.6. Interaktionsstudien.....	47
2.2.6.1. BiFC.....	47
2.2.6.2. <i>in vitro-pulldown</i> -Experiment.....	47
2.2.7. Methoden zur Arbeit mit Pflanzen.....	48
2.2.7.1. Pflanzenanzucht.....	48
2.2.7.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> -Anzucht.....	48
2.2.7.1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> -Hormonbehandlung.....	48
2.2.7.1.3. Anzucht unter verschiedenen Lichtqualitäten.....	49
2.2.7.1.4. <i>Nicotiana benthamiana</i> -Anzucht.....	49
2.2.7.2. Plattenexperimente mit <i>A. thaliana</i>	49
2.2.7.2.1. <i>A. thaliana</i> -Samen-Sterilisation.....	49
2.2.7.2.2. Wachstumsexperimente auf Platten.....	49
2.2.7.2.3. Keimungsanalysen.....	50
2.2.7.3. Stabile <i>A. thaliana</i> -Transformation und Selektion.....	50
2.2.7.4. Kreuzung von <i>Arabidopsis</i> -Linien.....	50
2.2.7.5. Histochemische Färbung der Glucuronidase-Aktivität.....	50
2.2.7.6. Fluoreszenzmikroskopie.....	51
2.2.7.7. Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	51
2.2.7.8. Histologie und Färbung der Sprossanatomie.....	51
2.2.7.8.1. Paraffineinbettung, Mikrotomschnitte und Astrablau- Safraninrot-Färbung.....	51
2.2.7.8.2. Handschnitte und Phluroglucinoelfärbung.....	52
2.2.8. Statistische Auswertung.....	52
3. Ergebnisse.....	53
3.1. Analyse der <i>in vivo</i> -Funktion der CPK28.....	53
3.1.1. Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien von <i>CPK28</i>	53
3.1.1.1. Bestimmung des T-DNA-Insertionsortes in Linien mit Insertionsereignis in <i>CPK28</i>	53
3.1.1.2. Nachweis eines Resttranskripts in <i>cpk28</i> -Mutanten.....	54
3.1.1.3. Genetische Analysen der <i>cpk28</i> -T-DNA-Insertionslinien.....	55
3.1.1.3.1. Untersuchung der Dominanz des <i>cpk28</i> -Phänotyps in heterozygoten WT/ <i>cpk28-1</i> -Pflanzen.....	55
3.1.1.3.2. Komplementationstest auf Allelie der Linien <i>cpk28-1</i> und <i>cpk28-2</i>	56
3.1.2. Phänotypische Untersuchung der <i>cpk28</i> -T-DNA-Insertionslinien.....	56
3.1.2.1. Sprosselongation.....	56
3.1.2.2. Blattmorphologie.....	58
3.1.2.3. Anthocyangehalt.....	58
3.1.2.4. Sprossapikalmeristem.....	59

3.1.2.5. Sprossanatomie.....	60
3.1.2.6. Ligningehalt.....	62
3.1.3. Expressionsanalysen von Markergenen des sekundären Dickenwachstums.....	62
3.1.4. Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisation von CPK28.....	64
3.1.4.1. CPK28-Expressionsprofil in <i>pCPK28::GUS</i>	64
3.1.4.2. Subzelluläre Lokalisation von CPK28.....	65
3.1.5. Komplementationsanalysen durch Expression verschiedener CPK28- Enzymvarianten in <i>cpk28-1</i>	66
3.1.5.1 Phänotypische Komplementation durch Überexpression bzw. Expression der CPK28 unter dem nativen Promotor.....	67
3.1.5.2. Komplementation durch gewebespezifische Expression von CPK28.....	69
3.1.5.3. Komplementation durch Veränderung der subzellulären Lokalisation.....	70
3.1.5.4. Komplementation durch verkürzte, konstitutiv-aktive CPK28.....	71
3.1.6. Penetranz des <i>cpk28</i> -Phänotyps.....	72
3.1.6.1. Wachstumsphänotyp von <i>cpk28</i> in unterschiedlichen Langtagbedingungen (Percival vs. Gewächshaus)	72
3.1.6.2. Einfluss unterschiedlicher Lichtqualitäten auf <i>cpk28</i>	73
3.1.6.2.1. Hypocotylelongation.....	73
3.1.6.2.2. Der <i>cpk28</i> -Phänotyp unter verschiedenen Lichtqualitäten.....	75
3.2. Zusammenhang zwischen CPK28 und dem Hormonhaushalt in <i>A. thaliana</i>	76
3.2.1. Analyse der Bedeutung von CPK28 im Gibberellin-Haushalt.....	76
3.2.1.1. Phänotypische Analyse von <i>cpk28</i> nach externer Hormongabe... 76	
3.2.1.2. Expressionsanalyse von Markergenen des Gibberellinsäure- metabolismus‘.....	78
3.2.1.3. Analyse früher gibberellinsäure-abhängiger Wachstums- prozesse in <i>cpk28</i>	80
3.2.1.4. Zusammenhang zwischen GA-Haushalt und sekundärem Dickenwachstum in <i>cpk28</i>	81
3.2.2. Analyse der Rolle von CPK28 im Jasmonat-Haushalt.....	83
3.2.2.1. JA-abhängige Markergenexpression.....	83
3.2.2.2. Genetische Interaktion von CPK28 und Mutanten des JA- Hormonhaushaltes.....	85
3.3. Biochemische Charakterisierung der CPK28.....	86
3.3.1. <i>In vitro</i> -Kinaseaktivität der CPK28.....	86
3.3.2. Substratspezifität der CPK28.....	88
3.3.3. Analyse der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495 von CPK28. 89	
3.3.3.1. <i>In vivo</i> -Identifikation per Massenspektrometrie.....	89
3.3.3.2. <i>In vitro</i> -Funktionalität der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495.....	90
3.3.3.3. Phänotypische Komplementationsanalyse der CPK28- Phosphorylierungs-Varianten.....	91
3.4. Interaktionsanalysen mit CPK28.....	92
3.4.1. Lokalisation der putativen Interaktionspartner.....	94

3.4.2. Interaktionsanalyse durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	95
3.4.3. <i>In vitro</i> -Interaktionstest.....	96
3.4.4. Charakterisierung von <i>pp2c</i> -T-DNA-Insertionslinien bzw. PP2C-Überexpressionslinien.....	97
3.4.4.1. Phänotypische Beschreibung von <i>pp2c</i> und <i>35S::PP2C-YFP</i>	98
3.4.4.2. Markergenexpression in <i>pp2c</i> und <i>35S::PP2C-YFP</i>	99
4. Diskussion.....	103
4.1. Biochemische Charakterisierung der CPK28.....	103
4.1.1. Die calcium-abhängige Proteinkinase CPK28.....	103
4.1.2. Analyse der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495.....	104
4.2. Analyse der <i>in vivo</i> -Funktion der CPK28.....	106
4.2.1. <i>cpk28</i> -T-DNA-Insertionslinien – Funktionsverlustmutanten oder nicht?.....	106
4.2.2. Der Entwicklungsphänotyp in <i>cpk28</i> – keine Redundanz innerhalb der CPK-Familie.....	107
4.2.3. Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisation von CPK28.....	108
4.2.4. CPK28-Enzymvarianten und ihre <i>in vivo</i> -Funktionalität.....	109
4.2.5. Penetranz des <i>cpk28</i> -Phänotyps.....	112
4.2.6. Die Rolle der CPK28 im sekundären Dickenwachstum.....	114
4.3. Zusammenhang zwischen CPK28 und dem Hormonhaushalt in <i>A. thaliana</i>	115
4.3.1. Die Funktion der CPK28 im Gibberellinsäuremetabolismus.....	116
4.3.2. Der Zusammenhang von GA und CPK28 in der vaskulären Entwicklung	118
4.3.3. Die Bedeutung von CPK28 im Jasmonat-Haushalt.....	119
4.3.4. CPK28 und PP2C – Regulatoren der JA-Signaltransduktion?	122
4.3.5. CPK28 in der GA-JA-Balance.....	124
4.4. Entwicklungsspezifisches Calcium: Wie wird CPK28 aktiviert?	126
4.4.1. Calcium und Gibberellin.....	127
4.4.2. CPK28 in der Signalkaskade nach mechanischer Stimulation.....	127
5. Literatur.....	132
Lebenslauf.....	XV
Publikationen / Poster und Präsentationen	XVI
Danksagung.....	XVII
6. Anhang.....	XVIII

Zusammenfassung

Nach einer vegetativen Wachstumsphase vollziehen Pflanzen den reproduktiven Phasenwechsel, durch den bei Rosettenpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* neben dem Blühen auch Elongation der Internodien und damit des Sprosses induziert wird.

Diese Arbeit charakterisiert die calcium-anhängige Proteinkinase AtCPK28 als regulatorische Komponente, die die Sprosselongation und vaskuläre Entwicklung kontrolliert und damit spezifisch zur Pflanzenentwicklung nach dem Umschalten in die reproduktive Phase beiträgt. In zwei unabhängigen Mutanten-Allelen der *cpk28* konnte, spezifisch nach dem Übergang in die reproduktive Phase, drastische Reduktion der Sprosselongation beobachtet werden, begleitet von der Verkürzung der Petiolen und Anthocyanakkumulation. Anatomische Analyse der basalen Sprossinternodien legte ein verändertes Muster der Sprossanatomie in *cpk28* offen, charakterisiert durch Reduktion trachealer Xylemelemente und gleichzeitig verstärktem sekundärem Dickenwachstum mit ektopischer Lignifizierung. Übereinstimmend wurde in *cpk28* erhöhte Expression von zellspezifischen Aktivatoren des sekundären Dickenwachstums im Spross beobachtet.

Zusätzlich konnte ein Einfluss der CPK28-Funktion auf den Phytohormonstatus der Pflanze gezeigt werden. Der *cpk28*-Phänotyp konnte durch exogene Applikation von Gibberellinsäure (GA) partiell revertiert werden. Störungen im GA-Metabolismus wurden durch spezifisch in der reproduktiven Entwicklungsphase reduzierte Expression von Schlüsselenzymen der GA-Biosynthese in *cpk28* bestätigt. Erste Analysen zum Zusammenhang zwischen CPK28 und dem Jasmonsäure-(JA)-Status der Pflanze lassen verstärkte JA-Signaltransduktion in *cpk28* vermuten. Zum einen konnte erhöhte Expression von JA-Markergenen in *cpk28* festgestellt werden, zum anderen wurde der *cpk28*-Sprosselongationsphänotyp in Doppelmutanten durch Aufhebung der JA-Biosynthese bzw. der JA-Signaltransduktion vollständig revertiert.

Calcium-abhängige Kinaseaktivität der CPK28 konnte *in vitro* bestätigt werden. Außerdem führte Expression der aktiven Kinase im *cpk28*-Hintergrund zur vollständigen Reversion des Entwicklungsphänotyps, während Expression der inaktiven Kinase CPK28-D188A keine Veränderung bewirkte. Dies belegt die essentielle Rolle der CPK28 für die normale Pflanzenentwicklung.

CPK28-Expression unter den gewebespezifischen Promotoren *pSUC2* und *pKNAT1*, die Proteinexpression in anderen Geweben vermitteln als in dieser Arbeit für den *CPK28*-Promoter gezeigt, war ebenfalls ausreichend für die vollständige Komplementation des *cpk28*-Phänotyps. Dies lässt vermuten, dass mit Hilfe der CPK28-Aktivität möglicherweise ein mobiles Signal zur Sprosselongation generiert oder weitervermittelt wird.

Weiterhin konnte *in vivo*-Autophosphorylierung der CPK28 an drei Phosphorylierungsstellen gezeigt werden. Austausch der jeweiligen Aminosäuren führte für zwei der drei untersuchten Stellen zu reduzierter, weiterhin calcium-abhängiger Kinaseaktivität *in vitro*. Allerdings konnte unabhängig von der *in vitro*-Aktivität für jede der untersuchten Phosphorylierungsvarianten Komplementation der morphologischen Defekte von *cpk28* *in vivo* beobachtet werden.

AtCPK28 als Regulator der koordinierten Sprosselongation und des sekundären Dickenwachstums stellt damit eines der wenigen Beispiele dar, das Calcium-Signaltransduktion mittels CDPKs direkt mit einem wichtigen, stadienspezifischen Entwicklungsprozess in Verbindung bringt.

Summary

After a period of vegetative growth plants undergo a developmental switch to the reproductive phase, inducing flowering and, in plants with a rosette habit like *Arabidopsis thaliana*, the transition to bolting and elongation of the inflorescence stem.

This work identified the calcium-dependent protein kinase AtCPK28 as a regulatory component controlling stem elongation and vascular development, specifically contributing to plant development after this switch to the generative phase. In two independent mutant alleles of *cpk28*, a severe reduction of stem elongation, accompanied by shorter leaf petioles and enhanced anthocyanin levels, was observed upon the transition to the reproductive phase. Anatomical analysis of the basal internode of the stem revealed an altered vascular pattern in *cpk28*, characterised by fewer xylem tracheary elements and increased secondary growth and ectopic lignification. Coincident, *cpk28* mutants showed enhanced expression of cell type-specific key activators of secondary growth in the stem. Additionally, an impact of CPK28 function on the phytohormone status of the plant was demonstrated. The *cpk28* phenotype was partially reverted by exogenous application of gibberellic acid (GA). Disturbances in GA metabolism were confirmed by transcriptional repression of key regulators of GA homeostasis in *cpk28*, specifically at later stages of plant development. First analyses of the influence of CPK28 on the jasmonic acid (JA) status indicate increased JA signalling in *cpk28*, since expression of JA marker genes was enhanced in *cpk28* and its shoot elongation phenotype could be fully reverted in double mutants blocking JA synthesis or JA signalling.

In vitro protein kinase activity of CPK28 was demonstrated to be strictly calcium-dependent. Expression of active kinase in the *cpk28* background led to a complete

restoration of the phenotype while inactive protein CPK28-D188A did not, proving the essential role of CPK28 for plant development.

CPK28 expression under the tissue specific promoters *pSUC2* and *pKNAT1*, driving protein expression in defined tissues different from the expression pattern conferred by the *CPK28* promoter, was also sufficient for complementation of the phenotype. This might be due to a mobile signal generated or propagated with the help of CPK28 activity. Furthermore, CPK28 was phosphorylated *in vivo* at several sites. Site-specific amino acid substitutions at two of the three phosphorylation sites resulted in reduced *in vitro* activity. However, when introduced into a *cpk28* mutant background, all phosphorylation site variants complemented the morphological and developmental defects.

AtCPK28 as a regulator for coordinated stem elongation and secondary growth represents one of the few examples directly linking calcium signalling via CDPKs to an important stage-specific developmental process.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Struktureller Aufbau von CDPKs.....	2
Abbildung 1-2: Stammbaum der 34 CPKs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> aufgrund Sequenzhomologie.	5
Abbildung 1-3: Vergleich von primärem und sekundärem <i>Arabidopsis</i> -Sprossquerschnitt.....	10
Abbildung 1-4: Photomorphogenese in <i>Arabidopsis</i>	13
Abbildung 1-5: Hormonregulierte Wachstumsprozesse in <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
Abbildung 1-6: Homöostatische Regulation des Gibberellinsäuremetabolismus und der GA-Signaltransduktion.....	17
Abbildung 1-7: Vereinfachtes Schema der JA-Biosynthese und stressinduzierte JA-Signaltransduktion im Zusammenspiel mit Ethylen (ET).	19
Abbildung 1-8: Modell des Konflikts zwischen Abwehr und Wachstum basierend auf dem antagonistischen Wechselspiel zwischen GA- und JA-Signaltransduktion...	22
Abbildung 3-1: Genstruktur der <i>CPK28</i> und Lokalisation der T-DNA-Insertionen.....	54
Abbildung 3-2: <i>CPK28</i> -Resttranskriptanalyse in <i>cpk28</i> -T-DNA-Insertionslinien.....	54
Abbildung 3-3: Morphologie heterozygoter <i>cpk28</i> -Pflanzen.....	55
Abbildung 3-4: Test auf Allelie der <i>cpk28</i> -T-DNA-Insertionslinien.....	56
Abbildung 3-5: Rosettenmorphologie und Sprosselongation von Wildtyp und <i>cpk28</i> -Mutanten.....	57
Abbildung 3-6: Zeitabhängige Ausprägung des <i>cpk28</i> -Phänotyps.....	57
Abbildung 3-7: Blattmorphologie von Wildtyp und <i>cpk28</i> -Mutanten.....	58
Abbildung 3-8: Anthocyanengehalt von WT und <i>cpk28</i> -Mutanten.....	59
Abbildung 3-9: Anzahl der Blütenanlagen in Infloreszenzen von WT und <i>cpk28</i> -Mutanten.....	60
Abbildung 3-10: Sprossanatomie von Wildtyp und <i>cpk28</i> -Mutanten.....	61
Abbildung 3-11: Quantifizierung des Ligningehalts in unterschiedlichen Geweben von Wildtyp und <i>cpk28</i> (46 Tage LD).....	62
Abbildung 3-12: Induktion der NST-Genexpression in <i>cpk28</i>	63
Abbildung 3-13: Genexpression von NST1 (A), NST2 (B) und NST3 (C) in Wildtyp und <i>cpk28</i> -Insertionslinien.....	63
Abbildung 3-14: Promotoraktivität des <i>CPK28</i> -Gens.....	64
Abbildung 3-15: Subzelluläre Lokalisation von CPK28.....	66
Abbildung 3-16: <i>In vivo</i> -Komplementation durch Expression von CPK28.....	67
Abbildung 3-17: Reversion der phänotypischen Ausprägungen von <i>cpk28</i> in Überexpressions- und Komplementationslinien.....	68
Abbildung 3-18: Reversion des <i>cpk28</i> -Phänotyps im sekundären Dickenwachstum durch Expression von aktivem CPK28-Protein.....	68
Abbildung 3-19: Komplementation des <i>cpk28</i> -Phänotyps durch gewebespezifische Expression von CPK28.....	69
Abbildung 3-20: Genexpression von <i>NST1</i> (A) und <i>NST3</i> (B) in Wildtyp, <i>cpk28</i> -Insertionslinien und <i>pSUC2::CPK28-YFP</i> bzw. <i>pKNAT1::CPK28-YFP</i>	70
Abbildung 3-21: <i>In vivo</i> -Komplementation durch Expression von CPK28 mit veränderter subzellulärer Lokalisation.....	70
Abbildung 3-22: <i>In vivo</i> -Komplementation durch Expression der konstitutiv-aktiven CPK28.....	71
Abbildung 3-23: <i>cpk28</i> -Sprosselongationsphänotyp in unterschiedlichen Langtagumgebungen.....	72

Abbildung 3-24: Hypocotylelongation in unterschiedlichen Lichtqualitäten.....	74
Abbildung 3-25: <i>cpk28</i> -Sprosselongationsphänotyp in unterschiedlichen Lichtqualitäten	76
Abbildung 3-26: Einfluss externer Gibberellingabe auf <i>cpk28</i> -T-DNA-Insertionslinien.....	77
Abbildung 3-27: Morphologie von Wildtyp und <i>cpk28</i> unter Gabe weiterer Pflanzenhormone	78
Abbildung 3-28: Genexpression von Markergenen des Gibberellinsäuremetabolismus...	79
Abbildung 3-29: Genexpression von <i>GA20ox1</i> (A) und <i>GA3ox1</i> (B) in Wildtyp, <i>cpk28</i> und Komplementationslinien.....	79
Abbildung 3-30: Gibberellin-abhängige Prozesse im vegetativen Stadium der Pflanze...	80
Abbildung 3-31: Genexpression in Wildtyp und <i>cpk28</i> nach Behandlung mit Gibberellinsäure.....	81
Abbildung 3-32: Sprossanatomie in Wildtyp und <i>cpk28</i> nach Gibberellinsäurebehandlung.....	82
Abbildung 3-33: Zeitabhängige Genexpression von jasmonat-responsiven Markergenen.....	83
Abbildung 3-34: Genexpression von Markergenen in JA-Biosynthese und Signaltransduktion.....	84
Abbildung 3-35: JA-abhängige Genexpression in Wildtyp und <i>cpk28</i> nach Behandlung mit Gibberellinsäure.	85
Abbildung 3-36: Reversion des <i>cpk28</i> -Sprosselongationsphänotyps durch Veränderungen im Jasmonathaushalt bzw. –signaltransduktion.....	86
Abbildung 3-37: Calcium-abhängige <i>in vitro</i> -Kinaseaktivität von CPK28-Varianten.....	87
Abbildung 3-38: <i>In vitro</i> -Substratspezifität der CPK28.....	88
Abbildung 3-39: <i>In vivo</i> -Phosphorylierungsstellen von CPK28.....	90
Abbildung 3-40: Calcium-abhängige Kinaseaktivität der CPK28-Phosphorylierungsvarianten.....	91
Abbildung 3-41: <i>In vivo</i> -Komplementation der CPK28-Phosphorylierungsvarianten.....	91
Abbildung 3-42: Subzelluläre Lokalisation der putativen Interaktionspartner der CPK28.	95
Abbildung 3-43: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von CPK28 und PP2C.....	96
Abbildung 3-44: <i>In vitro</i> -Interaktionsanalyse von CPK28 und PP2C.....	97
Abbildung 3-45: Phänotyp der <i>pp2c</i> -T-DNA-Insertionslinien bzw. PP2C-Überexpressionslinien.....	98
Abbildung 3-46: Subzelluläre Lokalisation der transgenen Proteine in <i>35S::PP2C-YFP</i> und <i>35S::CPK28-YFP</i>	99
Abbildung 3-47: Markergenanalyse in PP2C-Funktionsverlust- und –gewinnmutanten.	100
Abbildung 4-1: Modell für die Rolle der CPK28 in der Wahrnehmung von mechanischem Stress.	129
Abbildung 6-1: Genomische Sequenz von <i>CPK28</i> (At5g66210).....	XVIII
Abbildung 6-2: Codierende Sequenzen (CDS) der putativen CPK28-Interaktoren mit interagierender Sequenz.....	XIX
Abbildung 6-3: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte (nicht maßstabsgetreu).....	XXIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Pflanzenlinien.....	24
Tabelle 2-2: Für diese Arbeit generierte Pflanzenlinien.....	25
Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme.....	26
Tabelle 2-4: Ausgangsvektoren.....	26
Tabelle 2-5: Arbeitsvektoren.....	27
Tabelle 2-6: Vektoren zur Proteinexpression in Pflanzen.....	28
Tabelle 2-7: Vektoren zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	29
Tabelle 2-8: Verwendete Enzyme, Proteine, Antikörper und Größenstandards.....	29
Tabelle 2-9: Verwendete Nährmedien.....	30
Tabelle 2-10: Verwendete Antibiotika.....	30
Tabelle 2-11: PCR-Programm Power SYBR Green.....	34
Tabelle 2-12: PCR-Programm.....	35
Tabelle 2-13: Restriktionsklonierungen.....	36
Tabelle 2-14: Mutagenese-Reaktionen.....	37
Tabelle 2-15: Programm für zielgerichtete Mutagenese-PCR.....	39
Tabelle 2-16: Zusammensetzung Trenngel-Sammelgel.....	43
Tabelle 6-1: Oligonukleotide für Restriktionsklonierungen.....	XX
Tabelle 6-2: Mutagenese-Oligonukleotide.....	XXI
Tabelle 6-3: Oligonukleotide für Insertionsnachweis in <i>cpk28-1</i> bzw. <i>cpk28-2</i> per Sequenzierung.....	XXI
Tabelle 6-4: Genotypisierungs-Oligonukleotide.....	XXI
Tabelle 6-5: Oligonukleotide für semi-quantitative RT-PCR.....	XXII
Tabelle 6-6: Oligonukleotide für qRT-PCR.....	XXII

Abkürzungsverzeichnis:

µC	Microcurie	Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i>
µg	Microgramm		Ökotyp Columbia-0
µl	Microliter	C-Terminus	Carboxy-Terminus
µM	micromolar	Cys	Cystatin-ähnliches Protein
35S	Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotor 35S	D	Aspartat
A	Alanin	d	Tag(e)
Abb.	Abbildung	ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
ABA	Abscisinsäure	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzen-sulfonyl-fluorid	DNase	Desoxyribonuklease
AP	Alkaline Phosphatase	dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
APS	Ammonium-peroxodisulfat	DMF	Dimethylformamid
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DTT	Dithiothreitol
ATP	Adenosin-Triphosphat	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EDTA	Ethylendinitrioltetraessigsäure
BCIP	Tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation	ET	Ethylen
bp	Basenpaar(e)	<i>et al.</i>	und andere
BR	Brassinosteroid	flg22	Flagellin22
BSA	Rinderserum-Albumin	fwd	<i>forward</i>
bzw.	beziehungsweise	g	Gramm
C	Celsius	GA	Gibberellinsäure
Ca²⁺	Calcium	Glyk	Glykosylhydrolase-ähnliches Protein
ca.	circa	GST	Gluthation-S-Transferase
CAD	CDPK-aktivierende Domäne	GUS	β-Glucuronidase
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
CaS	Calcium-Sensor	h	Stunde(n)
CBL	Calcineurin B-ähnliche Proteine	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
CCaMKs	calcium-calmodulin-abhängigen Kinasen	HRP	Meerrettich Peroxidase
CDPK/ CPK	calcium-abhängige Proteinkinase	IAA	Auxin
CDS	codierende Sequenz	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
cDNA	komplementäre DNA	JA	Jasmonsäure
CIPK	CBL-interagierende Proteinkinase	JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
CK	Cytokinin	kb	Kilobasen
CLD	calmodulin-ähnliche Domäne	kDa	Molekulargewicht, Kilodalton
CMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus (<i>cauliflower mosaic virus</i>)	LB	<i>left-border</i>
Co-IP	Coimmunopräzipitation	Ler	<i>Landsberg erecta</i> , Ökotyp <i>A. thaliana</i>
		M	molar
		MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
		MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

MES	2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure	s	Sekunde(n)
MeJA	Methyl-Jasmonat	S	Serin
mg	Milligramm	SA	Salicylsäure
min	Minute(n)	SAM	Sprossapikalmeristem
ml	Milliliter	SDS	Natrium-dodecylsulfat
mRNA	<i>messenger</i> RNA	SnRK	SNF-verwandte Serin/Threonin-Kinasen
MS	Murashige & Skoog	T	Threonin
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	t	Zeit
nm	Nanometer	Tab.	Tabelle
Na	<i>Nicotiana attenuata</i>	TAIR	<i>Arabidopsis</i> Information Resource
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>	TBS	Tris-boratnatriumchlorid-Puffer
N-Terminus	Amino-Terminus	TBS-T	TBS-Puffer + Tween
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Temp.	Temperatur
PCR	Polymerasekettenreaktion	Tris	Tris-hydroxyl-methylaminomethan
PEG	Polyethylenglycol	U	<i>unit</i>
PP2C	Protein Phosphatase 2C	ÜN	Übernacht
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>	v	Volumen
RAM	Wurzelapikalmeristem (<i>root apical meristem</i>)	V	Volt
RB	<i>right-border</i>	VIGS	virus-induziertes Gen- <i>silencing</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop	VK	variable und Kinasedomäne, konstitutiv aktiv
rev	<i>reverse</i>	w	CDPK
RNA	Ribonukleinsäure	WT	<i>weight</i> (Gewicht)
RNase	Ribonuklease	X-Glc	Wildtyp
ROS	reaktive Sauerstoffspezies	YCE	X-Gluc 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute	YNE	eYFP C-terminus
RT	Raumtemperatur	YFP	eYFP N-terminus
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>	z. B.	<i>yellow fluorescent protein</i> zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion in Pflanzen – Calcium als sekundärer Botenstoff

In einer sich ständig verändernden Umwelt müssen Pflanzen als sessile Organismen auf diverse äußere und innere Einflüsse reagieren, die sowohl schnelle als auch dauerhaft anhaltende Adaptationen zur Sicherung des Überlebens und des reproduktiven Erfolgs erfordern. Nach Perzeption veränderter Bedingungen wie Lichtveränderungen, mechanischer Belastung, biotischer Reize wie Pathogenbefall oder abiotischer Stressfaktoren wie Kälte oder Salz und auch in der endogenen Phytohormon-signaltransduktion erfolgt Signalweiterleitung über sogenannte sekundäre Botenstoffe, z. B. Calcium, cyclisches AMP (cAMP) oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂), um die entsprechende Anpassung auf transkriptioneller, metabolischer und Protein-expressionsebene zu vollziehen. Dabei stellt Calcium als streng regulierter Botenstoff eine essentielle Rolle der Spezifizierung der Signaltransduktion dar. Unterschiedliche, klar definierte cytosolische Calcium-Anstiege, sogenannte Calcium-Signaturen (Webb *et al.* 1996), mit unterschiedlicher Frequenz, Amplitude, Dauer und zellulärer bzw. subzellulärer Lokalisation werden als stimulusspezifische Signaltransduktionsereignisse hervorgerufen. Sie resultieren durch Bindung an unterschiedliche Calcium-Sensorproteine in Veränderung der Gentranskription oder Proteinphosphorylierung, mit nachfolgender Modifikation der Proteinexpression und metabolischer Prozesse (McAinsh und Pittman 2009, Dodd *et al.* 2010, Kudla *et al.* 2010). In Pflanzen sind drei Klassen dieser calcium-bindenden Proteine bekannt, die calcium-abhängige Proteinphosphorylierungskaskaden hervorrufen können, und deren Verteilungsmuster in der Pflanze oder auch Zelle eine weitere Spezifikation der Signaltransduktion abhängig vom Calcium-Stimulus darstellt (Kudla *et al.* 2010): zum einen Calmodulin, dessen Signalweiterleitung nach Calcium-Bindung durch Interaktion mit calcium-calmodulin-abhängigen Kinasen (CCaMKs) stattfindet. Einen weiteren Calcium-Sensor stellen CBL-(Calcineurin B-like)-Proteine dar, deren Calcium-Bindung durch Interaktion mit CBL-interagierenden Proteinkinasen (CIPKs) Signalübertragung bewirkt. Außerdem existieren calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs), die Calcium-Sensor- und Effektorprotein in einem Molekül kombinieren (Harper und Harmon 2005, Dodd *et al.* 2010, Kudla *et al.* 2010)

1.2. Calcium-abhängige Proteinkinasen

Calcium-abhängige Proteinkinasen, nur in Pflanzen und einigen Apicomplexa wie *Plasmodium* oder *Toxoplasma* bekannt, sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die aufgrund ihrer Struktur einen Sonderfall der Calcium-Signaltransduktion darstellen, da Sensor- und Effektordomäne in einem Molekül zusammengefasst sind und somit ohne Interaktions-

partner oder weiteres Effektorprotein Calcium-Stimuli in Phosphorylungssignale umsetzen können (Harper *et al.* 2004, Harper und Harmon 2005).

1.2.1. Modularer Aufbau der CDPKs

Die Familie der calcium-abhängigen Proteinkinasen ist durch hohe Homologie der modularen Struktur charakterisiert. Die Anzahl der Isoformen variiert je nach Spezies, für *Arabidopsis thaliana* werden 34 Mitglieder beschrieben (Cheng *et al.* 2002). Der konservierte, klassische Aufbau von CDPKs besteht aus drei Domänen (Abb. 1-1).



Abbildung 1-1: Struktureller Aufbau von CDPKs: Dargestellt ist die Domänenstruktur mit der N-terminalen variablen Domäne (V), der Proteinkinase-Domäne (K) und der CDPK-aktivierenden Domäne (CAD), die das Pseudosubstratsegment (PS) und die C-terminale calmodulin-ähnliche Domäne (CLD) mit normalerweise vier calcium-bindenden EF-Händen (EF) umfasst. Abbildung entnommen aus Liese und Romeis (2012).

Am N-Terminus des Proteins liegt die variable Domäne, verantwortlich für die Variabilität der zahlreichen Isoformen innerhalb einer Spezies und bei vielen Isoformen mit Acylierungsmotiven (Myristoylierung und/oder Palmytoylierung zur Membranverankerung) versehen (Übersicht in Boudsocq und Sheen 2013). Weiter folgt die hochkonservierte Serin/Threonin-Proteinkinase-Domäne mit Substratbindungsstelle und ATP-Bindungsstelle im aktiven Zentrum. Die dritte Domäne stellt die CDPK-aktivierende Domäne (CAD) dar, die eine autoinhibitorische Pseudosubstrat-Region (vormals oft als eigene Domäne beschrieben) und die calcium-bindende Domäne (CLD = *Calmodulin-like domain*) mit vier EF-Hand-Motiven umfasst (Cheng *et al.* 2002, Liese und Romeis 2012). Die paarweise arbeitenden EF-Hand-Motive (N-terminale bzw. C-terminale EF-Hand-Schleife) zeigten in verschiedenen Untersuchungen unterschiedliche Calcium-Affinitäten (Rutschmann *et al.* 2002, Christodoulou *et al.* 2004). Eine unterschiedliche Funktion der jeweiligen Paare in der Calcium-Abhängigkeit der Kinaseaktivität konnte bestätigt werden (Franz *et al.* 2011).

1.2.2. Biochemische Aktivierung der CDPKs

Das gängige Modell der CDPK-Aktivierung beinhaltet eine duale Regulierung einerseits durch Calcium-Bindung und eine dadurch hervorgerufene Konformationsänderung des CDPK-Moleküls, zum anderen regulatorische Einflüsse durch Auto- bzw. Trans-Phosphorylierungsereignisse (Liese und Romeis 2012). Ebenso werden weitere Mechanismen wie Phospholipid-Bindung und Interaktion mit 14-3-3-Proteinen als regulatorische Komponenten diskutiert (Klimecka und Muszynska 2007, Lachaud *et al.* 2013).

1.2.2.1. Aktivierung durch Calcium-Bindung

In vitro-Analysen ließen schon lange auf eine inaktive CDPK-Konformation bei basalem Calcium-Level im Cytoplasma (100 – 200 nM) schließen, in der die Phosphorylierungsaktivität durch Bindung des Pseudosubstratsegments an das aktive Zentrum der Kinasedomäne unterbunden ist (Harper *et al.* 2004). Calcium-Bindung des C-terminalen EF-Hand-Paars auch im inaktiven Zustand der Kinase wurde aufgrund dessen hoher Calcium-Affinität diskutiert (Christodoulou *et al.* 2004). Bei stimulus-induziertem Anstieg des Calcium-Pegels im Cytosol wird durch Calcium-Bindung an das N-terminale EF-Hand-Paar eine Konformationsänderung hervorgerufen, welche die Autoinhibition durch Entfernen des Pseudosubstratsegments vom aktiven Zentrum aufhebt und Substratbindung und –phosphorylierung ermöglicht (Harper *et al.* 2004, Harper und Harmon 2005). Kristallstrukturanalysen sowohl calcium-freier, inaktiver als auch calcium-gebundener, aktivierter CDPK-Isoformen aus den Apicomplexa *Cryptosporidium parvum* und *Toxoplasma gondii* unterstützen und präzisieren diese lange postulierte Theorie der CDPK-Aktivierung mittels calcium-abhängiger Konformationsänderung (Ojo *et al.* 2010, Wernimont *et al.* 2010, Wernimont *et al.* 2011).

Trotz großer struktureller Ähnlichkeit innerhalb der CDPK-Proteinfamilie konnten bei Verwendung unterschiedlicher *in vitro*-Substrate einerseits sehr unterschiedliche calcium-abhängige Phosphorylierungsaktivitäten festgestellt werden (Curran *et al.* 2011), zum anderen wurde aber auch calcium-unabhängige Substratphosphorylierung gezeigt, die allerdings in manchen Fällen nur für spezifische Substrate detektiert werden konnte (Harper *et al.* 2004, Boudsocq *et al.* 2012). Aufgrund der Verwendung von biologisch meist nicht relevanten Substraten in *in vitro*-Analysen bleibt die Aussage über die tatsächliche Aktivierung und Aktivität der Kinasen mit ihrem *in vivo*-Substrat oft spekulativ. Jedoch verspricht der große Technikfortschritt der letzten Jahre hinsichtlich massenspektrometrischer Methoden zur Phospho-Proteomanalyse zukünftig eine Erleichterung der Identifikation von *in vivo*-Substraten.

1.2.2.2. Aktivierung durch Trans- bzw. Auto-Phosphorylierung

Zusätzlich zur beschriebenen Aktivierung mittels Calcium-Bindung ist seit langem ein Mechanismus der CDPK-Aktivierung durch Phosphorylierung, sowohl Auto- als auch Trans-Phosphorylierung durch andere Kinasen Gegenstand von Debatten. Intramolekulare Auto-Phosphorylierung wurde für diverse pflanzliche CDPKs in calcium-abhängiger Manier gezeigt (Rutschmann *et al.* 2002, Franz *et al.* 2011). Für eine CDPK aus der Goabohne konnte aber auch calcium-unabhängige Auto-Phosphorylierung nachgewiesen werden, welche allerdings calcium-abhängige Substratphosphorylierung beeinträchtigte (Saha und Singh 1995). Eine Untersuchung rekombinanter CDPKs aus

Arabidopsis ergab diverse *in vitro*-Auto-Phosphorylierungsstellen an unterschiedlichen Aminosäuren in allen drei Domänen (Hegeman *et al.* 2006). In dieser Studie konnten auch für rekombinantes CPK28-Protein drei *in vitro*-Auto-Phosphorylierungsstellen detektiert werden, nämlich je ein Serin an Position S228 bzw. S318 innerhalb der Kinase-Domäne und Serin S495 in der CAD (Hegeman *et al.* 2006), die im Verlauf dieser Arbeit weiter untersucht werden. Stimulus-abhängige Auto- und auch Trans-Phosphorylierungsereignisse konnten mit einer funktionalen *in vivo*-Aktivierung von CDPKs in Tabak korreliert werden (Romeis *et al.* 2001, Witte *et al.* 2010). Hier zeigte sich nach Pathogenstimulus ein isoformspezifisches Phosphorylierungsmuster der N-Termini von *Nt*CDPK2 und *Nt*CDPK3, das durch Austausch der beiden N-Termini jeweils auf die andere Isoform übertragen werden konnte und im Rahmen dessen die Auswirkung N-terminaler Phosphorylierung auf Substratzugänglichkeit und -spezifität diskutiert wird (Ito *et al.* 2010, Witte *et al.* 2010). Generell sind als Auswirkung der Phosphorylierung durch die Veränderungen der Protein-Oberflächeneigenschaften sowohl die strukturelle Stabilisierung des Proteins, Veränderungen der Substratzugänglichkeit, aber auch die Modifikation der Aktivität denkbar (Liese und Romeis 2012).

1.2.3. Die CPK-Proteinfamilie in *Arabidopsis*

Die Familie der CDPKs in *Arabidopsis thaliana* (in dieser Spezies CPK genannt) beinhaltet 34 Isoformen, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie vier Untergruppen zugeordnet werden (Abb. 1-2) (Cheng *et al.* 2002, Hrabak *et al.* 2003). Hierbei bildet die Untergruppe IV mit nur drei Mitgliedern, CPK16, CPK18 und der in dieser Arbeit untersuchten CPK28 die kleinste Gruppe mit verhältnismäßig geringer Sequenzähnlichkeit sowohl untereinander als auch zu den anderen CPK-Untergruppen. Ein funktioneller Zusammenhang entsprechend der Sequenzidentität der CPKs kann nicht zwangsläufig abgeleitet werden. So gibt es zwar Beispiele nahe verwandter CPKs mit ähnlicher oder redundanter Funktion wie CPK21 und CPK23 im abiotischen Stress (Franz *et al.* 2011) oder CPK17 und CPK34 im Pollenschlauchwachstum (Myers *et al.* 2009). CPK4 und CPK11 wird aber beispielsweise neben ihrer Rolle in der Abscisinsäure(ABA)-abhängigen Signaltransduktion (Zhu *et al.* 2007) zusätzlich gemeinsam mit den weiteren nahe verwandten Isoformen CPK5 und CPK6 eine Rolle im biotischen Stress zugeordnet (Boudsocq *et al.* 2010), wobei eben für letztgenannte Isoformen bislang kein Zusammenhang mit Regulationsmechanismen bei abiotischen Stressbedingungen bekannt ist. Auch eine ähnliche Funktion der phylogenetisch relativ entfernten CPK3 bzw. CPK6 aus unterschiedlichen Untergruppen in der Regulation von Kanälen in Stomata (Mori *et al.* 2006) widerspricht einer zwangsläufigen Korrelation von Verwandtschaft und funktioneller Übereinstimmung der CPKs.

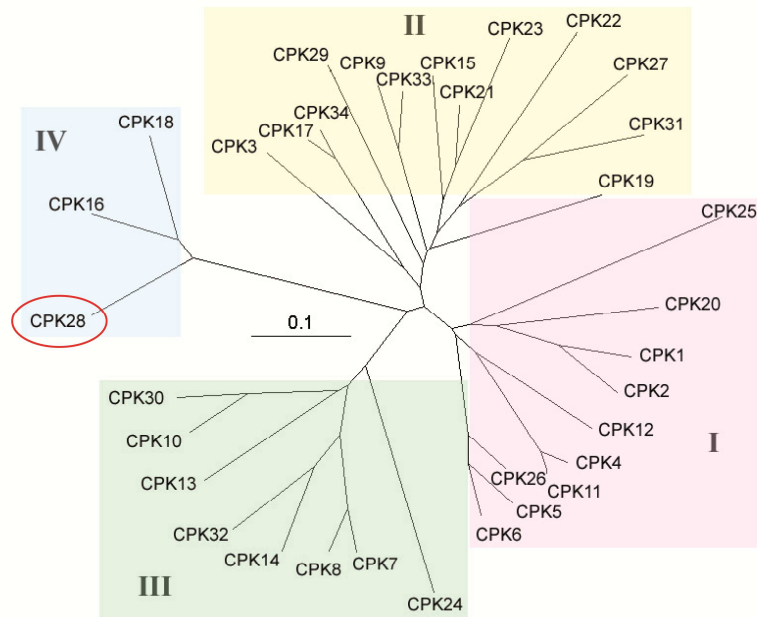


Abbildung 1-2: Stammbaum der 34 CPKs aus *Arabidopsis thaliana* aufgrund Sequenzhomologie. Die *A. thaliana*-CPK-Proteinfamilie ist in vier Untergruppen gegliedert, wobei die Astlänge des Baumes proportional zur Sequenzdifferenz der CPKs ist. Die in dieser Arbeit untersuchte CPK28 aus der Untergruppe IV ist rot markiert. Stammbaum modifiziert nach Cheng *et al.* (2002).

1.2.4. Biologische Funktionen von CDPKs

Die bisherigen Erkenntnisse zur Funktion von CDPKs, erzielt durch Expressionsanalysen, phänotypische Untersuchungen von Funktionsverlust- und -gewinnmutanten und *in vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierungsexperimente, bestätigen ein breites Aufgabenspektrum als positive oder negative Regulatoren im Zusammenhang mit schnellen, calcium-abhängigen Adaptationen in Pflanzen. Dabei ist eine einzelne CDPK-Isoform oftmals in unterschiedliche Prozesse involviert, wobei sowohl das räumliche als auch das zeitliche Expressionsmuster, und auch die subzelluläre Lokalisation oder die Anwesenheit der Substrate bzw. Aktivatoren der CDPK eine wichtige Rolle spielen (Liese und Romeis 2012).

Viele unterschiedliche stressinduzierte Vorgänge werden durch CDPK-abhängige Signaltransduktionsprozesse reguliert. So konnte für unterschiedliche CDPK-Funktionsverlust- bzw. -gewinnmutanten verbesserte abiotische Stresstoleranz gegenüber Salz- oder Trockenstress festgestellt werden (Zhu *et al.* 2007, Xu *et al.* 2010, Franz *et al.* 2011). Auch kälteinduzierte Anpassungen erfolgen teilweise mittels CDPK-Signaltransduktionskaskaden. In Reis konnte CDPK-Genexpressionszunahme nach Kältebehandlung gezeigt werden und Überexpression von *OsCDPK7* bzw. *OsCDPK13* verlieh Pflanzen gesteigerte Kältetoleranz (Saijo *et al.* 2000, Abbasi *et al.* 2004, Komatsu *et al.* 2007). Weiterhin regulieren CDPKs ABA-induzierte Prozesse wie Stomata-schließung oder ABA-abhängige Genexpression. Für eine Vielzahl von CPKs wurden in

diesem Zusammenhang Interaktionen mit unterschiedlichen Ionenkanälen gezeigt, die in der calcium-abhängigen Regulation der Schließzellenbewegung involviert sind (Mori *et al.* 2006, Geiger *et al.* 2010, Geiger *et al.* 2011, Brandt *et al.* 2012).

Reaktionen der Pflanzen auf biotische Interaktionen wie zum Beispiel pathogen-induzierte Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen werden ebenso über CDPKs vermittelt. So konnte bei Expression von konstitutiv-aktiver *NtCDPK2* in Tabak eine Induktion diverser Abwehrreaktionen wie Veränderungen in Genregulation und Hormongehalt, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und gezielte Zelltod-Entwicklung festgestellt werden (Romeis *et al.* 2001, Ludwig *et al.* 2005). Eine ähnliche Funktion für CPKs konnte auch in *Arabidopsis* durch Analysen von Mehrfach-CPK-Funktionsverlustmutanten gezeigt werden, die reduzierte pathogen-induzierte ROS-Ausbildung aufwiesen (Boudsocq *et al.* 2010), während Überexpression von *AtCPK1* verbesserte Resistenz gegenüber Pathogenbefall verlieh (Coca und Segundo 2010). Die von unterschiedlichen CDPKs induzierten Signalkaskaden zeigen ihre biologische Funktion in der Immunantwort in teils überlappenden, teils unterschiedlichen, hormonellen Regulationsmechanismen zur Pathogenabwehr (Ludwig *et al.* 2005, Gao *et al.* 2013). Für CPK3 und CPK13 aus *Arabidopsis* konnte eine Funktion in der Antwort auf Herbivorangriffe beobachtet werden, wobei vornehmlich die transkriptionelle Regulation der Abwehrsignaltransduktion durch diese CPKs bewirkt wird und kein direkter Einfluss auf phytohormon-gesteuerte Mechanismen gezeigt werden konnte (Kanchiswamy *et al.* 2010). CDPKs und andere calcium-abhängige Kinasen scheinen auch eine Rolle in der symbiotischen Interaktion mit Mikroorganismen zu spielen, wie Beispiele aus dem Bereich der Leguminosen belegen (Harper und Harmon 2005). So wiesen beispielsweise Pflanzen mit reduzierter Expression von *MtCDPK1* in *Medicago truncatula* reduzierte Kolonisation durch symbiotische Bakterien und Mykorrhiza auf (Ivashuta *et al.* 2005).

1.2.5. Entwicklungsspezifische CDPKs

Im Gegensatz zu den zahlreichen beschriebenen Funktionen von CDPKs in stress-induzierten Vorgängen ist weitaus weniger über calcium-abhängige Signaltransduktion in Entwicklungsprozessen bekannt. So ist bislang nur wenigen CDPKs eine Funktion in einem entwicklungspezifischen Prozess zugeordnet. Beispielsweise fungieren *AtCPK17* und *AtCPK34* als redundante Regulatoren bei der Ausbildung des Pollenschlauchwachstums (Myers *et al.* 2009). Eine CDPK aus *Pharbitis nil* zeigte Expressionsinduktion und Aktivitätssteigerung im Verlauf der Ausbildung der Blüten (Jaworski *et al.* 2012). Für *MtCDPK1* in *Medicago truncatula* konnte eine Bedeutung im Wurzel- und Wurzelhaarwachstum beobachtet werden (Ivashuta *et al.* 2005).

In den letzten Jahren wurden Hinweise für die Bedeutung von CDPKs auch in Mechanismen der Hormon-Signaltransduktion und -Regulation gesammelt, welche umgekehrt wiederum einen Einfluss auf die Expression oder Aktivität von CDPKs darstellen können (Harper und Harmon 2005). So ist beispielsweise die Expression unterschiedlicher CDPKs aus Reis durch das Wachstumshormon Gibberellinsäure (GA) induziert (Aboelsaad und Wu 1995, Yang *et al.* 2003), und für OsCDPK13 konnte zusätzlich erhöhte Phosphorylierungsaktivität nach Kälte und GA-Behandlung beobachtet werden (Abbasi *et al.* 2004). Für zwei unbekannte Reis-CDPKs wurde GA-abhängige Aktivierung beobachtet und diese werden in ihrer Funktion unterhalb des GA-bindenden Phospho-Proteins RuBisCO-Aktivase platziert (Sharma und Komatsu 2002). Auch in der Aleuronschicht von Gerstenkörnern wurde der Einfluss von CDPKs auf GA-vermittelte Antworten gezeigt (Ritchie und Gilroy 1998). In *Nicotiana attenuata* weisen Pflanzen mit simultan reduzierter Genexpression von *NaCDPK4/5* mittels virus-induziertem *Gene silencing* (VIGS) verminderte Sprosselongation auf. In diesen Pflanzen wurde Jasmonsäure-(JA)-Akkumulation, damit einhergehende erhöhte Resistenz gegenüber Fraßinsekten (Yang *et al.* 2012a) und eine Störung des GA-Metabolismus beobachtet (Heinrich *et al.* 2013). Eine gut untersuchte funktionale Beziehung einer calcium-abhängigen Proteinkinase mit dem Prozess der GA-Homöostase stellt die *in vivo*-Interaktion von *NtCDPK1* aus Tabak mit dem bZIP-Transkriptionsfaktor *Repressor of Shoot Growth* (RSG) dar. Dieser aktiviert direkt die Gibberellin-Biosynthese und wird nach GA-abhängiger Phosphorylierung durch *NtCDPK1* und nachfolgender 14-3-3-Proteininteraktion inaktiviert, womit die RSG-abhängige GA-Biosynthese reprimiert wird (Ishida *et al.* 2008). Reduktion der *NtCDPK1*-Genexpression resultierte in Pflanzen mit vermindertem Wachstum, abnormaler Zellmorphologie und Zelltod (Lee *et al.* 2003), während Pflanzen mit reduzierter *RSG*-Expression kürzere Internodien und somit reduzierte Sprosshöhe aufwiesen (Fukazawa *et al.* 2000). *NtCDPK1* stellt also einen negativen Regulator der GA-Homöostase und der GA-Signaltransduktion dar.

1.3. Interaktionsstudien mit CPK28: potentielle Interaktoren

Ein Hauptziel in der Charakterisierung von Proteinen ist die Klärung der genauen zellulären Funktion und der direkt aus der Proteinaktivität resultierenden, molekularen Veränderungen. Gerade im Falle von Proteinkinasen wie CPK28, deren molekulare Funktion mit der Phosphorylierung eines *in vivo*-Substrats eine Interaktion mit anderen Proteinen voraussetzt, bieten Proteininteraktionsanalysen einen hilfreichen Ansatz zur Aufklärung dieser zellulären Funktion. Interaktoren für CPK28 können entweder Substrate wie nachgeschaltete Kinasen, Transkriptionsfaktoren oder andere Enzyme sein, deren Aktivität oder Konformation mittels Phosphorylierung reguliert wird. Eine andere

Interaktionsmöglichkeit wäre Komplexbildung mit kinase-modifizierenden Proteinen, wie vorgeschalteten Kinasen oder Phosphatasen, die die Aktivität der CPK28 durch (De-) Phosphorylierung regulieren. Auch Hilfsproteine wie Chaperone oder Hitzeschockproteine könnten als Interaktoren identifiziert werden, die in der Zelle Proteinstabilität und/oder Komplexbildung der Kinase mit vor- bzw. nachgeschalteten Interaktoren unterstützen.

Im Labor stehen verschiedene Standardmethoden zur Proteininteraktionsanalyse zur Verfügung. Bei vollkommener Unkenntnis der potentiellen Interaktionspartner wie im Fall von CPK28 bieten sich Hochdurchsatz-Interaktionsstudien an, in denen die Wechselwirkung des Proteins mit einer möglichst vollständigen Proteinkollektion des Ursprungsorganismus untersucht wird. Dies ist zum Beispiel im heterologen Hefe-2-Hybridsystem recht effektiv und schnell möglich, in dem das analysierte Protein als Köder interagierende Proteine aus einer cDNA-Kollektion isolieren soll. Hier werden durch spezifische Proteininteraktion des Köderproteins mit dem Interaktor Teile eines Transkriptionsfaktors vereinigt und auf bestimmte Genexpression selektiert. Das Prinzip der Zusammenführung zweier Selektionsmarker-Hälften durch Proteininteraktion der mit dem Marker fusionierten Kandidatenproteine liegt auch weiteren Interaktionsanalysen wie dem Split-Ubiquitin-System zugrunde, und wird in der Pflanzenforschung heutzutage auch auf *in vivo*-Interaktionsanalysen in *Arabidopsis*-Mesophyllzellprotoplasten angewendet (Fujikawa und Kato 2007, Li *et al.* 2011).

1.4. Der Entwicklungszyklus von *Arabidopsis thaliana*

Der Wachstumszyklus von *Arabidopsis thaliana* als fakultative Langtagpflanze besteht aus einer zeitlich beschränkten vegetativen Wachstumsphase, unterteilt in eine juvenile und adulte vegetative Wachstumsphase. Dieser folgt die generative Phase, in der die Ausbildung von Blüten und die Fortpflanzung der Pflanze stattfinden. Nach meiotischen Zellteilungen läuft eine kurze haploide, gametophytische Phase ab, die mit der Vereinigung von männlichem und weiblichem Gametophyten in der Fertilisation ihren Abschluss findet. Entwicklung des Embryo, Samenreifung und -keimung führt zur Ausbildung des diploiden Sporophyten (Pflanze), der zwei organbildende Meristeme an entgegengesetzten Enden entwickelt, das Sprossapikalmeristem (*shoot apical meristem* = SAM) und das Wurzelmeristem (*root apical meristem* = RAM). Mit der juvenilen, vegetativen Wachstumsphase zur Biomassenzunahme beginnt der Lebenszyklus erneut (Huijser und Schmid 2011).

1.4.1 Der reproduktive Phasenwechsel

Der Übergang von vegetativem zu generativem Wachstum wird reproduktiver Phasenwechsel genannt und beinhaltet die Reprogrammierung des vegetativen SAM, im

vegetativen Stadium für die Bildung von Blattprimordien und somit der oberirdischen Organe wie Rosettenblätter verantwortlich, zum Infloreszenzmeristem und später zum Blühmeristem, nun verantwortlich für die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane, Blüten, etc. in der reproduktiven Phase (Huijser und Schmid 2011). Dieser Prozess wird Blühinduktion genannt und kann durch eine Reihe endogener oder auch externer Signale hervorgerufen werden. Vier Blühinduktionswege sind soweit bekannt und genetisch charakterisiert (Davis 2009). Die Wahrnehmung der Tageslänge stellt einen wichtigen Faktor dar, je nach Spezies wird bei Erreichen der sogenannten induktiven Photoperiode der molekulare Vorgang der Blühinduktion gestartet. Des Weiteren spielt das Pflanzenhormon Gibberellin eine wichtige Rolle, bei Wachstum in nicht-induktiver Photoperiode wurde GA als treibende Kraft der Blühinduktion identifiziert (Reeves und Coupland 2001). Außerdem liefern der Prozess der Vernalisation, einer verlängerten Kälteperiode, und der endogene Vorgang der autonomen Blühinduktion weitere Möglichkeiten zum Übergang in die reproduktive Phase, was weiterhin auch von Lichtqualität und Umgebungstemperatur beeinflusst wird (Davis 2009). Die verschiedenen Wege der Blühinduktion wirken auf den gleichen bzw. einen überlappenden Satz an Effektoren, sogenannten Blühintegratoren (*floral pathway integrators*), festgestellt, die eine Reihe Blühmeristemgene anschalten und somit Reprogrammierung des SAM und die Ausbildung der reproduktiven Phase initiieren (Amasino und Michaels 2010).

1.4.2. Wachstum in der reproduktiven Phase

Neben der Blühinduktion stellt in *Arabidopsis* die Induktion der Elongation der ersten Internodie (*bolting*) ein wichtiges Charakteristikum des reproduktiven Phasenwechsels dar (Pouteau und Albertini 2009). Die spezielle Architektur von Pflanzen ist je nach Spezies genau festgelegt und zeigt eine große Vielfalt unterschiedlicher Formen von Pflanzenkörpern, entsprechend der Anlage und Anzahl von Blättern, Internodienelongation und Blühzeitpunkt. *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise in der vegetativen Wachstumsphase charakteristisches Rosettenwachstum auf, indem die Ausbildung von Internodien als auch von lateralen Meristemen durch Wechselspiel der für die Apikaldominanz verantwortlichen Phytohormone Auxin und Cytokinin verhindert wird (Durbak *et al.* 2012). Nach dem Übergang in die reproduktive Phase jedoch wird schnelle Elongation der Internodien ermöglicht und laterale Meristeme entwickeln Seitensprosse und Blüten in einem regulären Spiralmuster entlang der Infloreszenz (Barton 2010). Die Ausbildung von Internodien und Nodien in Haupt- und Nebensprossen aufgrund des Zusammenspiels von Apikal- und Seitenmeristemen ist die hauptsächliche Ursache für die spezielle Architektur einer Pflanze (Sanchez *et al.* 2012). Die Verlängerung von Internodien ist mit der Zellproliferation und –elongation der Rippenzone, Zellen unterhalb

der zentralen Zone des Apikalmeristems, assoziiert (Fletcher 2002). Im Zuge der Elongation wird die Stabilität des Sprosses durch die Ausbildung des sekundären Dickenwachstums unterstützt.

1.4.3. Sekundäres Dickenwachstum

Ein Kennzeichen der reproduktiven Phase ist die Etablierung von sekundärem Dickenwachstums, ein Prozess des radialen Wachstums und der Verholzung des Sprosses durch Ausbildung von sekundärer Zellwand in spezifischen Zelltypen.

1.4.3.1. Etablierung des sekundären Dickenwachstums

Vermittelt wird das sekundäre Dickenwachstum durch das Kambium, ein laterales Meristem, das in diversen Spezifikationen in unterschiedlichsten Pflanzen zu finden ist (Du und Groover 2010). Der primäre Spross in *Arabidopsis* ist in Form einer sogenannten Eustele organisiert (Abb. 1-3A), in der die Leitbündel radial in das parenchymatische Gewebe im Zentrum des Sprosses eingebettet sind (Sanchez *et al.* 2012). Vor der Entwicklung des sekundären Dickenwachstums findet meristematische Aktivität nur innerhalb der Leitbündel statt, in welchen das faszikuläre Kambium (Prokambium) für die Ausbildung von primärem Xylem und primärem Phloem verantwortlich ist. Diese Gewebe stellen die Haupttransportachsen zur Versorgung des Pflanzenkörpers mit Assimilaten und Wasser dar (Du und Groover 2010). Neben dem Phytohormon Auxin wird eine Klasse von Transkriptionsfaktoren (*HD-ZIPIII* = Homöodomäne-Leucin-Zipper der Klasse III) für die Ausbildung und Organisation der Sprossanatomie verantwortlich gemacht (Sanchez *et al.* 2012).

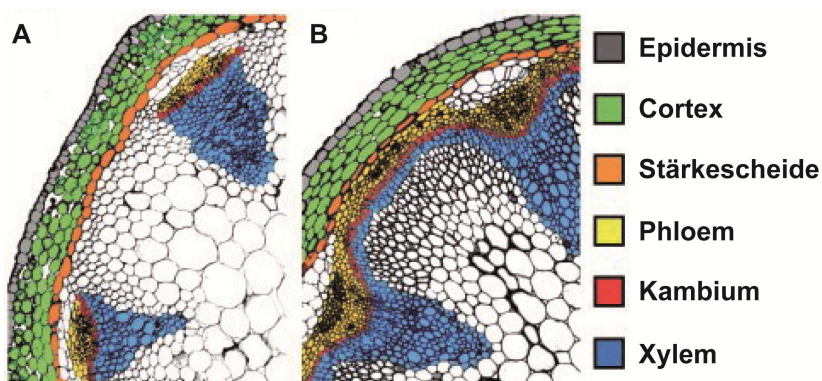


Abbildung 1-3: Vergleich von primärem und sekundärem *Arabidopsis*-Sprossquerschnitt.
Darstellung eingefärbter Schnitte durch einen primären (A) und sekundären (B) Spross von *Arabidopsis thaliana* mit farbiger Kennzeichnung der unterschiedlichen Gewebearten. Modifiziert nach Sanchez *et al.* (2012).

Im Verlauf des Wachstums weitet sich die kambiale Aktivität über die Leitbündel hinaus auf die interfazikuläre Region aus, was in einer schlauchartigen Struktur von meristematischem Gewebe entlang der Sprossachse resultiert (Abb. 1-3B) (Sehr *et al.* 2010). Kambiale Zellteilung führt nun zu lateralem Wachstum und zur Differenzierung von sekundärem Xylem (Holz) oder sekundärem Phloem (Borke). Laterales Wachstum kann in mehrere Hauptprozesse unterteilt werden: Zellproliferation des Kambiums,

Zellspezifizierung, Zellexpansion, Einlagerung von sekundärer Zellwand und kontrollierter Zelltod des Xylems (Zhang *et al.* 2011). Sekundäres Xylem ist aus unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt: nicht verholzte Xylemparenchymzellen, und zwei Arten verlängerter Zellen mit verstärkter sekundärer Zellwand, den wasserführenden trachealen Elementen und hauptsächlich zur Stabilisierung beitragenden sklerenchymatischen Xylemfasern (Zhang *et al.* 2011).

1.4.3.2. Sekundäre Zellwandbiosynthese

Entsprechend ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften wird zwischen primärer und sekundärer Zellwand unterschieden. Parenchymatische Zellen wie die Epidermis oder Markzellen im Inneren des Sprosses besitzen eine dünne, flexible Zellwand, hauptsächlich aus den Polysaccharidklassen Cellulose, Hemicellulose und Pektinen zusammengesetzt. Sklerenchymatische Zellen wie tracheale Elemente und Fasern des Xylems oder des interfaszikulären Bereichs lagern zur mechanischen Unterstützung des Pflanzenkörpers und Stabilisierung des Transports entlang des Sprosses zusätzlich eine rigide, sekundäre Zellwand zwischen Plasmamembran und primärer Zellwand ein (Wang und Dixon 2012). Diese wird erst nach Ende der Zellelongationsphase etabliert und besteht aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin, das in das Polysaccharid-Geflecht eingelagert wird (Yamaguchi und Demura 2010). Primäre und sekundäre Zellwände können aufgrund ihrer Fähigkeit zur Zellexpansion unterschieden werden (Lee *et al.* 2011) und Lignindeposition stellt einen klassischen Marker für die Ausbildung des sekundären Dickenwachstums dar (Ehltling *et al.* 2005).

Neben dem Einfluss diverser Phytohormone wie Auxin, Gibberellin, Cytokinin und Brassinosteroiden (Elo *et al.* 2009) auf das sekundäre Dickenwachstum stellt die transkriptionelle Regulation mittels unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren eine Hauptkomponente der Induktion sekundärer Zellwandsynthese dar (Zhang *et al.* 2011). Detaillierte Genexpressionsanalysen identifizierten mehrere Mitglieder der NAC- (*NAM*, *ATAF*, *CUC*)-Transkriptionsfaktor-Familie als zelltypspezifische Schlüsselregulatoren der sekundären Zellwandsynthese (Zhong *et al.* 2008). Expression dieser Transkriptionsfaktoren führt zur Anschaltung nachfolgender Transkriptionskaskaden durch diverse MYB-Transkriptionsfaktoren, die die Biosynthese von Elementen der sekundären Zellwand wie Cellulose, Hemicellulose und hauptsächlich Lignin vorantreiben (Wang und Dixon 2012). Die Transkriptionsfaktoren *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 (NST1)* und *NST3* stellen Initiatoren des sekundären Dickenwachstums vornehmlich in interfaszikulären Fasern und Xylemfasern dar (Mitsuda *et al.* 2007), während andere Familienmitglieder gleiche bzw. weitgehend überlappende Transkriptionskaskaden in anderen Geweben hervorrufen. *NST1* und *NST2* haben

redundante Funktionen in der sekundären Zellwandsynthese im Endothecium von Antheren (Mitsuda *et al.* 2005), während *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 (VND6)* und *VND7* die Differenzierung des Xylems zu trachealen Elementen in Spross und Wurzel vorantreiben (Wang und Dixon 2012). Funktionsverlust dieser Gene führte nur bei Mehrfachmutanten zur Reduktion der sekundären Zellwandsynthese, was auf Redundanz der Gene innerhalb der Familie hinweist. Überexpression der einzelnen Transkriptionsfaktoren führte zu ektopischer Lignifizierung von normalerweise parenchymatischen Geweben (Kubo *et al.* 2005, Mitsuda *et al.* 2005, Zhong *et al.* 2006, Mitsuda *et al.* 2007).

1.4.4. Regulatoren der Pflanzenentwicklung

Das Pflanzenwachstum wird neben genetisch determinierten Abläufen auch durch eine Vielzahl externer Faktoren wie Licht, Temperatur oder Wasser- und Nährstoffversorgung reguliert. Die Anpassung wird meist auf dem Niveau der Pflanzenhormone gesteuert, die den Entwicklungsfortgang entsprechend intrinsischer Vorgaben kombiniert mit der Reaktion auf Umwelteinflüsse regulieren. Dies geschieht über ein komplexes Netzwerk, das schnelle Anpassung der Wachstumsvorgänge oft mittels Proteindegradation von Signaltransduktionskomponenten wie z. B. Transkriptionsrepressoren und anschließender Veränderung von Genregulation, Proteinsynthese und des Metabolismus' ermöglicht (Wolters und Jürgens 2009).

1.4.4.1. Licht

Licht ist ein essentieller Faktor für das Pflanzenwachstum, zum einen stellt es Energie für in der Pflanze ablaufende Prozesse durch die Photosynthese zur Verfügung, zum anderen gibt es durch seine Stärke, Richtung, spektrale Zusammensetzung und auch Dauer wichtige Informationen über vorherrschende Umweltbedingungen an die Pflanze weiter (Fankhauser und Chory 1997). Die lichtabhängige Pflanzenentwicklung wird als Photomorphogenese bezeichnet, welche alle physiologischen Prozesse umfasst, die Reaktionen auf spezielle Lichtverhältnisse darstellen und in Abhängigkeit der genannten Parameter hohe morphologische Diversität bewirken können (Kami *et al.* 2010).

Eine Vielzahl von Ereignissen während des ganzen Lebenszyklus' ist unumstößlich mit der Wahrnehmung von Licht verbunden (Abb. 1-4). Sowohl Samenreifung und Brechung der Samenruhe (Dormanz), Keimungsinduktion und Hypocotylelongation des Keimlings, Phototropismus (Wachstum in Richtung der Lichtquelle), Schattenvermeidungsreaktion, Stomataöffnung, die circadiane Uhr, Blühinduktion und auch das Verzweigungswachstum des Sprosses sind lichtbeeinflusste Prozesse (Fankhauser und Chory 1997, Finlayson *et al.* 2010, Franklin und Quail 2010).

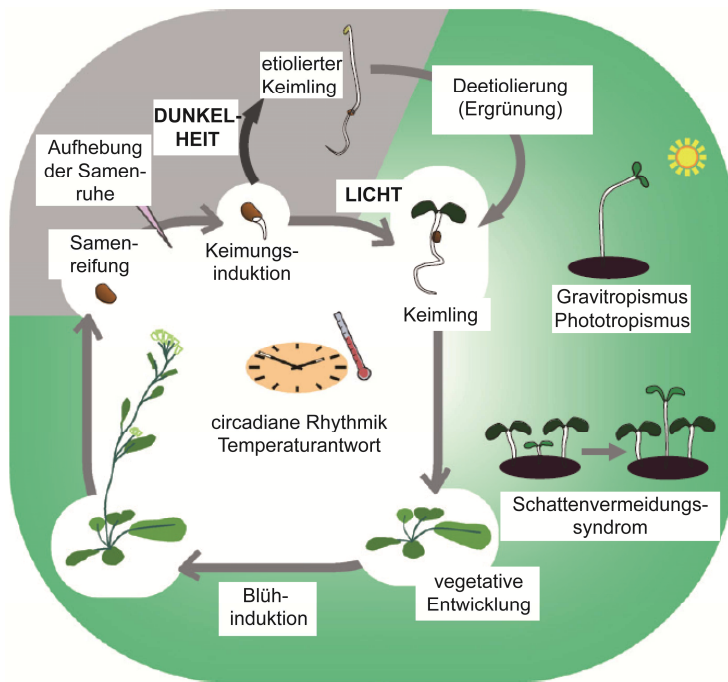


Abbildung 1-4: Photomorphogenese in *Arabidopsis*. Nach der lichtabhängigen Keimung erfolgt in Dunkelheit die Etiolierung des Keimlings, der bei Belichtung deetioliert. Im Licht entwickelt sich sofort ein photosynthetisch aktiver Keimling. Weitere Effekte des Lichts während des kompletten Lebenszyklus von Pflanzen sind dargestellt: Phototropismus, die circadiane Uhr, das Schattenvermeidungssyndrom, Blühinduktion. Abbildung modifiziert nach Kami *et al.* (2010)

1.4.4.1.1. Lichtperzeption und Signaltransduktion

Lichtperzeption geschieht in der Pflanze durch vier Klassen an Photorezeptor-Familien, die mittels eines in das apo-Protein eingelagerten Chromophors unterschiedliche Lichtqualitäten wie UV-A, UV-B, Rotlicht (*red* = R), Dunkelrotlicht (*far red* = FR), Blaulicht (*blue* = B) oder Grünlicht (*green* = G) wahrnehmen können (Fankhauser und Chory 1997). *Arabidopsis* besitzt fünf phytochrom-codierende Gene (*PHYA–E*) zur Rot- bzw. Dunkelrot-Perzeption, als UV-A- und Blaulicht-Rezeptoren dienen sowohl drei Cryptochrome (*CRY1–3*), zwei Phototropine (*PHOT1* und *PHOT2*), aber auch drei Mitglieder der *ZEITLUPE*-Familie (*ZTL*, *FKF1*, *LKP2*). Rezeptoren für UV-B und Grünlicht konnten bisher nicht identifiziert werden, jedoch wird diesen Lichtqualitäten auch eine Rolle in der Photomorphogenese zugesprochen (Kami *et al.* 2010). Die unterschiedlichen Photorezeptorklassen übernehmen teilweise redundante bzw. überlappende Funktionen, können gleichzeitig aber auch spezialisierte Antworten auf spezielle Lichtverhältnisse ausbilden. Phytochrome existieren in der Pflanze in zwei unterschiedlichen Konformationen. Die im Dunkeln synthetisierte Version Pr wird durch Rotlichtperzeption in die aktive Pfr-Konformation konvertiert, die das Absorptionsmaximum für Dunkelrotlicht besitzt und durch dessen Wahrnehmung wieder in die inaktive Pr-Form überführt werden kann. Aktivierte Phytochrome translozieren in den Nucleus und setzen dort Signalkaskaden zu umfangreicher Genexpressionsregulation in Gang (Franklin und Quail 2010). Cryptochrome sind im inaktiven und aktiven Zustand im Kern oder cytosolisch lokalisiert, und Aktivierung von Phototropinen geschieht durch chromophor-induzierte Relokalisierung des Proteins von der Plasmamembran ins Cytosol oder Golgi. (Auto)-Phosphorylierung

wird als Mechanismus zur Aktivierung der Signaltransduktion für Phototropine und auch Cryptochrome und Phytochrome diskutiert (Jiao *et al.* 2007, Kami *et al.* 2010).

Lichtabhängige Signaltransduktion erfolgt unter anderem über die Mechanismen der Protein-Protein-Interaktion, Veränderung der Proteinstabilität, insbesondere von Transkriptionsfaktoren, und bereits erwähnte Kinaseaktivitäten. Ein gut untersuchtes Beispiel stellt die Interaktion der aktivierten Phytochrom-Form Pfr mit Transkriptionsrepressoren lichtabhängiger Prozesse, PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), im Nucleus dar, woraufhin PIFs phosphoryliert und im Proteasom degradiert werden und somit Genexpressionskaskaden aktiviert werden (de Lucas *et al.* 2008, Franklin und Quail 2010). Mitglieder der COP/DET/FUS-Gruppe verhindern im Dunkeln Photomorphogenese durch proteasomale Degradation diverser Transkriptionsfaktoren, und werden bei Lichtperzeption durch aktivierte Phytochrome oder Cryptochrome inhibiert, woraufhin zentrale Transkriptionsfaktoren wie z. B. ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) akkumulieren und Signalwege initiiert werden (Kami *et al.* 2010, Lau und Deng 2010). Neben lichtabhängiger Expressionsregulation wird die Aktivität von Transkriptionsfaktoren auch auf posttranslationaler Ebene kontrolliert, so kann z. B. lichtvermittelte Phosphorylierung die subzelluläre Lokalisation determinieren (Jiao *et al.* 2007).

1.4.4.1.2. Lichtabhängige Elongationsprozesse

Wildtypkeimlinge etiolieren in Dunkelheit, sie bilden verstärkt elongierte, unpigmentierte Hypocotyle mit geschlossenen Keimblättern aus und beziehen ihre Energie aufgrund mangelnder Photosynthese aus den Speicherstoffen des Samens (Kami *et al.* 2010). Bei Lichtperzeption wird das Elongationswachstum verlangsamt, Pigmente und Chloroplasten zur Photosynthese werden etabliert und die Cotyledonen werden entfaltet (Franklin und Quail 2010). Die primär verantwortlichen Photorezeptoren für diesen Prozess variieren je nach Lichtbedingungen. Unter Weißlicht stellt z. B. PHYB den hauptsächlichen Rezeptor und somit Repressor der Hypocotylelongation dar (Koorneef *et al.* 1980). Störungen in der Wahrnehmung bzw. Signaltransduktion verschiedener Lichtqualitäten können durch Deetiolierungsexperimente identifiziert werden, da die entsprechenden Mutanten aufgrund gestörter Lichtperzeption bei Bestrahlung mit Weißlicht oder spezifischen Lichtqualitäten etioliertes Keimlingswachstum wie in Dunkelheit zeigen (Fankhauser und Casal 2004).

Einen Sonderfall des lichtabhängigen Elongationswachstums stellt das phytochrom- und cryptochrom-vermittelte Schattenvermeidungssyndrom dar. In dicht bewachsenen Gebieten, im Schatten größerer Pflanzen ändert sich die Zusammensetzung des Lichts, in einem reduzierten R zu FR-Verhältnis und verminderter photosynthetischer Effizienz resultierend. Pflanzen reagieren auf diese Veränderung mit gesteigerter Hypocotyl-, Spross- und Petiolenelongation, verfrühter Blühinduktion und erhöhter Apikaldominanz,

wobei diese Prozesse über schnelle, PIF-abhängige Genexpressionsveränderungen vermittelt werden (Franklin und Quail 2010).

Auch das Elongationswachstum in der reproduktiven Phase, hauptsächlich den Spross aber auch die Petiolen betreffend, ist ein lichtbeeinflusster Prozess. Einerseits konnte blaulichtabhängiges phototropisches Wachstum in Spross und Petiolen detektiert werden (Kagawa *et al.* 2009), andererseits sind seit langem phytochromabhängige Elongationsprozesse in Apikaldominanz, Petiolenelongation und Internodienwachstum bekannt (Reed *et al.* 1993, Devlin *et al.* 1996, Devlin *et al.* 1998). Die Mehrfachmutante *phyABE* zeigt z. B. eine auffällige Störung in der Rosettenbildung, da hier die eigentlich stark verkürzten Internodien auch im vegetativen Wachstum elongieren und somit sichtbare Internodien zwischen den Rosettenblättern entstehen (Devlin *et al.* 1998).

1.4.4.2. Entwicklungsspezifische Phytohormone

Für die Regulation von Wachstumsvorgängen der Pflanze werden aufgrund der charakterisierten Mutanten hauptsächlich vier Phytohormonklassen verantwortlich gemacht: Auxin (IAA), Gibberellin (GA), Cytokinin (CK) und Brassinosteroide (BR) (Depuydt und Hardtke 2011). Die weiteren klassischen Phytohormone Jasmonsäure (JA), Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA) und Ethylen (ET) werden meist in der stress-induzierten Adaptation des Metabolismus diskutiert und spielen für Entwicklungsprozesse eine eher untergeordnete Rolle. Neben den klassischen Hormonen wurden auch andere Substanzklassen wie Peptide, peptid-ähnliche Faktoren und Stringolactone als wachstumsmodulierende Substanzen identifiziert (Wolters und Jürgens 2009). Während Cytokinine eine wichtige Bedeutung für die Regulation der Zellteilung und Aufrechterhaltung der meristematischen Organisation des SAM und RAM haben, üben Auxin, GA und BR ihre Funktionen in der Wachstumsregulation über die Effekte der Zellelongation aus (Depuydt und Hardtke 2011).

Abbildung 1-5 zeigt einen schematischen Überblick unterschiedlicher Wachstumsphasen aus *Arabidopsis thaliana*. Zur Verdeutlichung der komplexen Hormonregulation im pflanzlichen Lebenszyklus wird beispielhaft das Zusammenspiel der Hormone Auxin, GA und BR auf die Ausprägung der entsprechenden Phasen dargestellt. Jede Substanzklasse hat Einfluss auf vielfältige Vorgänge, die in einem komplexen Netzwerk aufeinander abgestimmt wirken. Prozesse wie das Wurzelwachstum oder die Hypocotyl-elongation sind beispielsweise von allen drei dargestellten Hormonen abhängig, andere Vorgänge wie die Bildung lateraler Organe oder die Internodienelongation werden durch die Wechselwirkung von Gibberellin und Auxin beeinflusst. Insgesamt wird im Lebenszyklus von Pflanzen eine sehr komplexe Hormonregulation durchgeführt, die intensive Kontrolle und Regulation der Biosynthese-, Degradations- und Signal-

transduktionskomponenten des Phytohormonnetzwerks erfordert. Pflanzen mit veränderter Hormonregulation bilden oftmals Aberrationen in Wachstum und Entwicklung, aber auch in der Resistenz gegenüber Stressbedingungen aus, weshalb eine Klassifizierung der Phytohormone entsprechend ihrer Entwicklungsspezifität meist ungenügend ist.

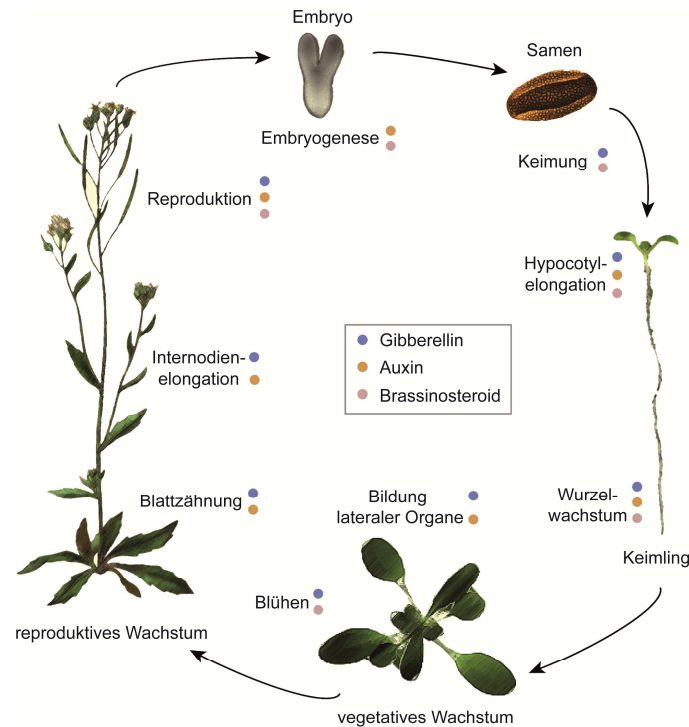


Abbildung 1-5: Hormonregulierte Wachstumsprozesse in *Arabidopsis thaliana*. Dargestellt ist ein vereinfachter Lebenszyklus von *Arabidopsis*. Die entsprechenden Prozesse, in denen den jeweiligen Hormonen Gibberellin, Auxin bzw. Brassinosteroiden eine Rolle zugeordnet wird, sind farblich gekennzeichnet. Modifiziert nach Depuydt und Hardtke (2011).

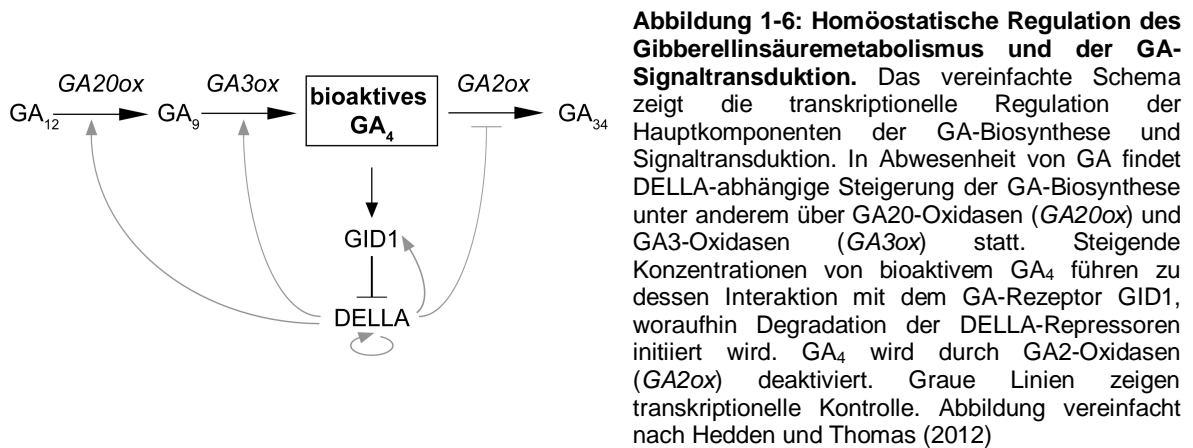
Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit essentiellen Phytohormone Gibberellinsäure und Jasmonsäure und deren Einfluss auf Entwicklungsprozesse detaillierter beschrieben.

1.4.4.2.1. Gibberellinsäure

Gibberelline umfassen ein großes Spektrum an Diterpenoid-Substanzen mit momentan 136 identifizierten unterschiedlichen Molekülvariationen, von denen jedoch nur wenige biologisch aktiv sind (Hedden und Thomas 2012). Diese aktiven Gibberelline sind weithin als wichtige Regulatoren diverser Wachstumsprozesse mittels Zell- und Organelongationsereignissen in Pflanzen bekannt (Richards *et al.* 2001). Mutanten im GA-Metabolismus werden oft als kleinwüchsige Pflanzen beschrieben (Koorneef und Vanderveen 1980) und ihre phänotypischen Merkmale wie reduzierte Sprosselongation oder verdickte dunkelgrüne Blätter können durch exogene Applikation von Gibberellin behoben werden. GA spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-zu-Zell-Kommunikation zur

Etablierung von Zellelongation und Zelldifferenzierung (Yamaguchi 2008). Auch entwicklungspezifische Phasenwechsel, wie z. B. zwischen Samenruhe und –keimung oder der Übergang zur reproduktiven Phase werden durch unterschiedliche GA-Spezies beeinflusst (Hedden und Thomas 2012).

Sowohl die GA-Biosynthese als auch GA-Signaltransduktionsprozesse unterlagen in den letzten Jahren intensiven Untersuchungen. Die GA-Biosynthese, vor allem die Expression der Multigen-Familien der GA20-Oxidasen (*GA20ox*) und GA3-Oxidasen (*GA3ox*), verantwortlich für die letzten Schritte der Synthese bioaktiver GAs, und auch der GA-inaktivierenden GA2-Oxidasen (*GA2ox*) sind durch diverse Rückkopplungsmechanismen reguliert, um eine stabile GA-Homöostase im pflanzlichen System aufrechtzuerhalten (Abb. 1-6) (Yamaguchi 2008, Hedden und Thomas 2012).



In Abwesenheit von GA findet die Unterdrückung unterschiedlicher Entwicklungsprozesse durch sogenannte DELLA-Wachstumsrepressoren statt (Schwechheimer 2011). Diese Proteinfamilie mit fünf Mitgliedern in *Arabidopsis* ist nach den ersten Aminosäuren der stark-konservierten DELLA-Domäne benannt, die für die Repressorfunktion essentiell ist (Willige *et al.* 2007). Bei entsprechenden GA-Konzentrationen bindet bioaktives GA an die GA-Rezeptoren GA-INSENSITIVE DWARF (GID1, GID2 und GID3 in *Arabidopsis*), interagiert daraufhin direkt mit DELLA-Proteinen in einem GA-GID-DELLA-Komplex und führt so zu deren proteasomaler Degradation (Murase *et al.* 2008, Shimada *et al.* 2008), wodurch GA-Wachstumsprozesse initiiert werden. Der direkte Einfluss der DELLAs auf die Transkription von GA-Metabolismus- und GA-Rezeptorgenen bestätigt die komplexe Regulation der GA-Homöostase (Zentella *et al.* 2007). Die repressive Wirkung der DELLA-Proteine wird durch Interaktion mit unterschiedlichen Klassen regulatorischer Proteine ausgeübt. So binden DELLAs beispielsweise direkt an die Transkriptionsfaktoren der PIF-Familie, verhindern somit nachgeschaltete Signaltransduktion lichtinduzierter Prozesse wie Hypocotylelongation oder Keimung (de Lucas *et al.* 2008, Feng *et al.* 2008, Richter *et al.* 2010) und stellen damit einen wichtigen Integrator von Licht- und Phytohormon-Signaltransduktion dar. Andererseits konnte ebenso DELLA-Interaktion mit

anderen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, die Entwicklungsprozesse der Schoten (*ALCATRAZ = ALC*) bzw. Blüten und Cotyledonen (*SPATULA = SPT*) oder auch Keimung und Hypocotylelongation (*SCARECROW-LIKE3 = SCL3*) beeinflussen (Schwechheimer 2011). Durch die proteasomale Degradation der DELLAs erfolgt die Aufhebung der repressiven Interaktion und folglich wird Signaltransduktion durch weitere Transkriptionsfaktoren initiiert.

Neben Entwicklungsprozessen im vegetativen Pflanzenstadien wie Keimung, Hypocotyl-elongation oder Blatexpansion ist GA auch für seine koordinierende Rolle im reproduktiven Entwicklungsstadium zur Sicherung des Fortpflanzungserfolgs bekannt, besonders in der Blühinduktion (Eriksson *et al.* 2006) oder der Internodienelongation (Hoogendoorn *et al.* 1990). Die letztgenannten Vorgänge werden beide von Gibberellin, jedoch unabhängig in unterschiedlichen Prozessen gesteuert (Evans 1999). GA wurde, im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen wie Auxin, auch eine Rolle in der Etablierung von sekundärem Wachstum zugewiesen (Elo *et al.* 2009). Vor allem durch die spezifische Verteilung in unterschiedlichen Geweben der Vaskulatur, mit der höchsten GA-Konzentration im Xylem lokalisiert, scheint es einen Einfluss auf den Aufbau von Zellstrukturen und die Differenzierung von Faserzellen zu haben (Mauriat *et al.* 2011, Dayan *et al.* 2012). Ebenso spielt GA eine essentielle Rolle in der Xylemexpansion des Hypocotyls (Ragni *et al.* 2011), und konnte in jener Studie als mobiles Signal identifiziert werden.

1.4.4.2.2. Jasmonate

Das lipid-basierte Phytohormon Jasmonsäure (JA) und seine Metabolite, zusammengefasst unter dem Begriff Jasmonate, wurden lange Zeit vor allem als stressinduzierte Signalkomponenten nach biotischen Interaktionen wie Verwundung durch Insektenfraß (Howe *et al.* 1996, Wu und Baldwin 2010) oder dem Angriff nekrotropher Pathogene (Feys *et al.* 1994), aber auch nach abiotischen Reizen wie Salz- bzw. Trockenstress charakterisiert (Zhu 2002). JA induziert die Akkumulation verschiedener Sekundärmetabolite mit diversen physiologischen Funktionen, vorrangig im Zuge der Schädlingsabwehr (Pauwels *et al.* 2009). Während der Aufklärung der physiologischen Effekte konnte auch eine wachstumshemmende Wirkung von JA, unter anderem auf das Wurzelwachstum beobachtet werden. Weitere JA-beeinflusste Entwicklungsprozesse sind Samenreifung, Fertilität und auch Seneszenz (Turner *et al.* 2002, Wasternack 2007). Jasmonate inhibieren Wachstum durch Unterdrückung der Mitose im Apikalmeristem, was bei wiederholter Verwundung und somit wiederholter JA-Akkumulation zur Wachstumsretardation führte (Zhang und Turner 2008). Andererseits wird JA in der Verwundungsreaktion synthetisiert und verleiht Resistenz gegenüber Fraßinsekten oder nekrotrophen

Mikroorganismen (Feys *et al.* 1994, Howe *et al.* 1996, Zhang und Turner 2008). Im Zuge dieser dualen Rolle wird JA als balancierende Komponente zwischen Wachstum und Abwehrreaktion in Antwort auf eine dynamische Umwelt diskutiert.

Abbildung 1-7 zeigt ein Schema der JA-Biosynthese mit den teilweise bioaktiven JA-Metaboliten (A) und der JA-Signaltransduktion (B) mit Fokus auf die für die vorliegende Arbeit analysierten JA-Markergene.

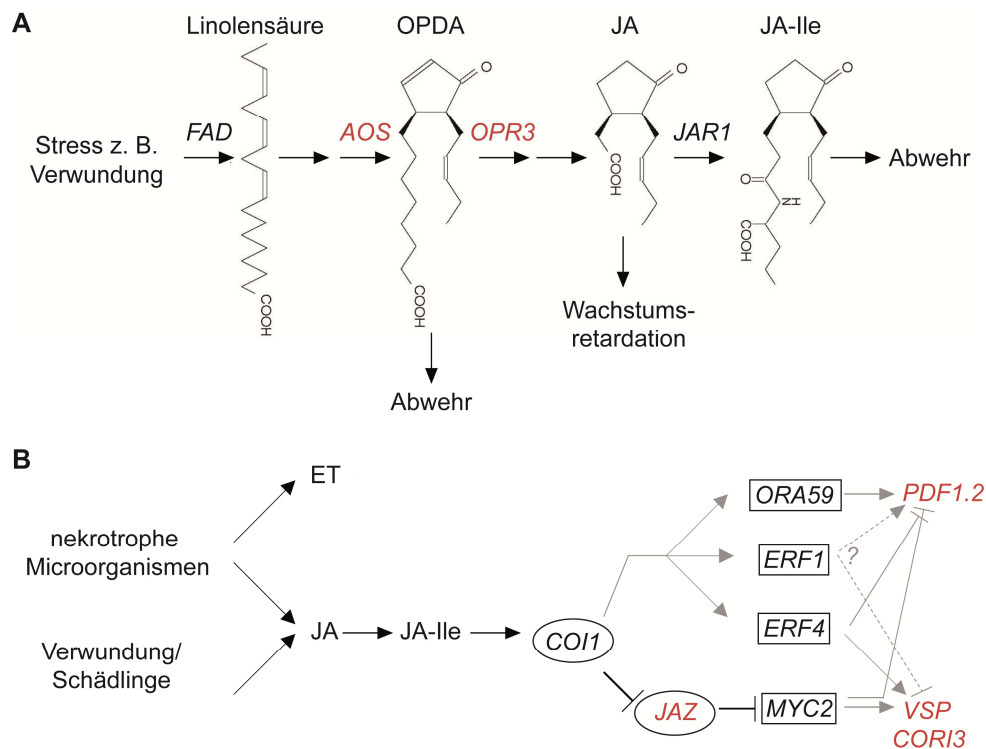


Abbildung 1-7: Vereinfachtes Schema der JA-Biosynthese und stressinduzierte JA-Signaltransduktion im Zusammenspiel mit Ethylen (ET). **A** Die Biosynthese von JA: JA wird in mehreren Schritten, u. a. von Fettsäure-Desaturasen (FAD) über 12-Oxophytodiensäure (OPDA), durch die Schlüsselenzyme Allenoxidsynthase (AOS) und 12- Oxophytodiensäure-Reduktase 3 (OPR3) synthetisiert. JAR1 katalysiert die Verbindung von JA mit Isoleucin (JA-Ile). **B** Stressinduzierte JA-Signaltransduktion im Zusammenspiel mit ET: JA wird simultan mit ET produziert und induziert die Expression von Transkriptionsfaktoren, z. B. *ORA59*, *ERF1* oder *ERF4* mittels *COI1*. JA-Ile-Bindung an *COI1* führt zu *JAZ*-Degradation und hebt *MYC2*-Repression auf. *MYC2* aktiviert Expression von verwundungsresponsiven Genen (*VSP*) und unterdrückt andere Gene, z. B. *PDF1.2*. JA und ET kooperieren bei der Induktion von *ORA59*, *ERF1* und *ERF4*. *ORA59* reguliert Expression von *PDF1.2*, die Rolle von *ERF1* ist unklar (gestrichelte Linie). *ERF4* unterdrückt die Expression von JA/ET-responsiven Genen. Graue Pfeile stellen transkriptionelle Induktion, Striche Repression dar. In Rot sind die in dieser Arbeit untersuchten JA-Markergene gekennzeichnet. Kombiniert aus Zhang und Turner (2008), Memelink (2009).

Nach der Wahrnehmung biotischer oder abiotischer Stressfaktoren wird Linolensäure als JA-Vorläufer aus den Plastidmembranen freigesetzt (Turner *et al.* 2002). Über mehrere Intermediate erfolgt die JA-Synthese mittels der Schlüsselenzyme Allenoxidsynthase (AOS) und 12-Oxophytodiensäure-Reductase3 (OPR3). Zwar werden Oxophytodiensäure (OPDA), JA und auch Methyl-Jasmonat (MeJA) eine biologisch-wirksame Rolle in unterschiedlichen Prozessen zugeordnet (Wasternack 2007, Zhang und Turner 2008), als hauptsächlich bioaktive Komponente der Jasmonate wurde jedoch JA-Isoleucin (JA-Ile)

identifiziert (Fonseca *et al.* 2009), das durch die Konjugation von JA an Isoleucin durch das Enzym JASMONATE RESISTANT1 (JAR1) entsteht (Abb. 1-7A). Die Regulation der JA-Signaltransduktion funktioniert auf ähnliche Weise wie für die GA-Signalweiterleitung beschrieben. Bei niedrigem JA-Gehalt in der Pflanze wird JA-abhängige Genexpression durch JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-Repressoren mit zwölf Familienmitgliedern in *Arabidopsis* unterdrückt (Chini *et al.* 2007, Thines *et al.* 2007). Durch Bindung von bioaktivem JA-Ile an das momentan als primären Rezeptor diskutierte CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1)-Protein findet eine Interaktion zwischen JA-Ile-COI1 und den JAZ-Faktoren statt, was zur proteasomalen Degradation der JAZ-Faktoren und damit zur Aktivierung JA-abhängiger Gentranskription und Akkumulation von Sekundärmetaboliten führt (Howe 2010, Pauwels und Goossens 2011).

In der Reaktion auf nekrotrophe Pathogene wird neben JA auch die Biosynthese von Ethylen (ET) simultan induziert und sowohl gemeinsame als auch getrennte Signaltransduktion wird veranlasst (Abb. 1-7B) (Memelink 2009). JA bewirkt die Aufhebung der JAZ-vermittelten Repression des Transkriptionsfaktors MYC2 durch COI1-abhängige Degradation der JAZ-Faktoren. MYC2 initiiert daraufhin die Expression von verwundungsresponsiven Genen (VSP). JA und ET kooperieren bei der Induktion z. B. von *OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59 (ORA59)* oder anderer *ETHYLEN RESPONSIVE FACTOR- (ERF)*-Proteine, was z. B. Expressionssteigerung von *PLANT DEFENSIN1.2 (PDF1.2)* bewirkt, einem Markergen der koordinierten JA/ET-Antwort (Abb. 1-7B). In diesem Fall wirkt MYC2 jedoch als transkriptioneller Repressor, JA alleine führt nicht zur Induktion der *PDF1.2*-Expression (Memelink 2009).

Funktionsverlustmutanten in der JA-Biosynthese oder Signaltransduktion sind oftmals männlich-steril, was die Notwendigkeit von JA für die Fertilität untermauert (Feys *et al.* 1994, Stintzi und Browse 2000). Im Gegenzug dazu induziert die Akkumulation von JA, z. B. durch wiederholte Verwundung, Wachstumsinhibition (Zhang und Turner 2008). Auch genetische bedingte JA-akkumulierende Mutanten weisen reduziertes Wachstum auf, oft begleitet von Merkmalen wie vermindertem Rosettendurchmesser, deformierten Blättern, Anthocyanakkumulation oder erhöhter Resistenz gegenüber Fraßinsekten oder nekrotrophen Mikroorganismen (Ellis und Turner 2001, Xu *et al.* 2001, Turner *et al.* 2002, Caño-Delgado *et al.* 2003, Bonaventure *et al.* 2007, Hyun *et al.* 2008, Yang *et al.* 2012a). Manche dieser Charakteristika können ebenso durch JA-Behandlung hervorgerufen werden können (Ellis *et al.* 2002a).

Bemerkenswerterweise wird JA-Akkumulation in vielen Mutanten mit Defekten in der primären oder auch sekundären Zellwandbiosynthese beobachtet. So stellen beispielsweise *constitutive expression of VSP1 (cev1)*, *radially swollen1 (rsw1)* oder *ectopic lignin1 (eli1)* Funktionsverlustmutanten von Cellulose-Synthasen dar, deren

Wachstumsphänotyp oft auch vom Auftreten ektoptischer Lignifizierung unterschiedlicher Gewebe begleitet wird (Ellis *et al.* 2002a, Caño-Delgado *et al.* 2003). Weiterhin wird der Einfluss von Calcium auf die JA-Regulation diskutiert, da beispielsweise simultane Unterdrückung der *NaCDPK4/5*-Expression in *Nicotiana attenuata* JA-Akkumulation bewirkt (Yang *et al.* 2012a). Auch die Mutante *fatty acid oxygenation upregulated2 (fou2)* aus *Arabidopsis*, die eine *gain-of-function*-Variante des calcium-durchlässigen Kanals TPC1 der Vakuole exprimiert, zeigt einen interessanterweise stadienspezifischen, JA-abhängigen Wachstumsphänotyp (Bonaventure *et al.* 2007).

1.4.4.2.3. Die GA-JA-Balance – Wachstum oder Verteidigung?

Ein Forschungsfokus der letzten Jahre lag unter anderem auf der Aufklärung des Zusammenhangs unterschiedlicher Phytohormon-Regulationsmechanismen zur Feinabstimmung pflanzlicher Entwicklungsprozesse. Dabei wurde die Wechselwirkung zwischen GA und JA als wichtige Komponente der Entscheidung der Pflanze identifiziert, Energie in Wachstumsvorgänge oder Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen zu investieren (Kazan und Manners 2012). Der antagonistische Effekt von GA und JA konnte in DELLA-Mutanten anhand reduzierter JA-abhängiger Abwehrreaktionen beobachtet werden, während konstitutiv-aktive DELLA-Repressoren erhöhte JA-Markergen-Expression bewirkten (Navarro 2008). Mit dem Nachweis der direkten Interaktion von DELLAs und JAZ-Faktoren (Hou *et al.* 2010, Wild *et al.* 2012, Yang *et al.* 2012b) wurde die Theorie der kontrollierten Balance zwischen GA und JA gestärkt, in der je nach Umweltsituation der eine oder andere hormon-abhängige Prozess präferiert wird (Abb. 1-8).

DELLAs interagieren mit JAZ-Repressoren und verhindern so die JAZ-abhängige MYC-Signaltransduktion. In Abwesenheit von Pathogenen besteht ein kompetitives Gleichgewicht zwischen GA und JA, in dem sowohl DELLAs und MYCs um JAZ-Bindung als auch JAZs und PIFs um DELLA-Bindung konkurrieren (Abb. 1-8A) (Kazan und Manners 2012). Unter optimalen Wachstumsbedingungen wird GA synthetisiert, DELLAs werden degradiert und dadurch wird JAZ-MYC-Interaktion stabilisiert, was wiederum JA-abhängige Prozesse inhibiert (Abb. 1-8B) (Hou 2010). Im Falle von Pathogenbefall oder Verwundung verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung JA-Signaltransduktion. Durch JA-abhängige JAZ-Degradation werden MYC-vermittelte JA-Prozesse in Gang gesetzt, während die stabilisierte DELLA-PIF-Interaktion Wachstumsprozesse reprimiert (Abb. 1-8C) (Yang *et al.* 2012b).

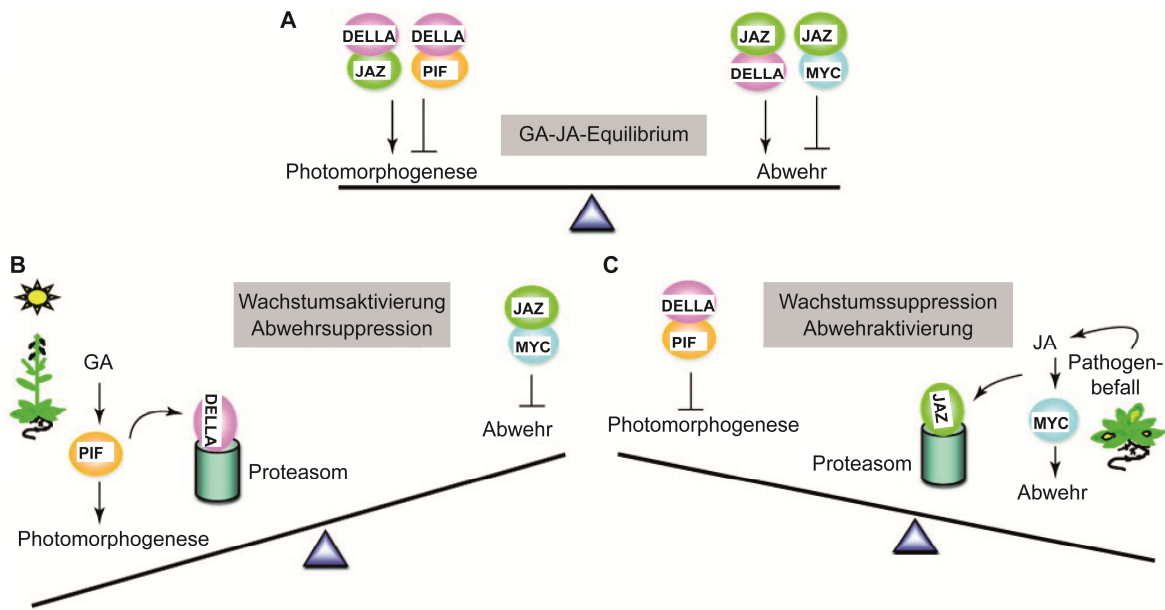


Abbildung 1-8: Modell des Konflikts zwischen Abwehr und Wachstum basierend auf dem antagonistischen Wechselspiel zwischen GA- und JA-Signaltransduktion. A Das Gleichgewicht zwischen GA- und JA-Signaltransduktion ist durch niedrige Abwehr-Genexpression und langsames Wachstum charakterisiert. Es herrscht Konkurrenz zwischen DELLAs und MYCs um JAZ-Bindung als auch zwischen JAZs und PIFs um DELLA-Bindung. B Geeignete Bedingungen fördern Wachstum durch GA-abhängige DELLA-Degradation, während Abwehrprozesse durch JAZ-vermittelte MYC-Repression unterbunden werden. C Bei Pathogenbefall und damit steigender JA-Konzentration erfolgt JAZ-Degradation und Aktivierung von Abwehrmechanismen, während Wachstumsprozesse durch DELLA-PIF-Interaktion unterbunden werden. GA = Gibberellin, JAZ = JASMONATE ZIM DOMAIN, MYC = basischer Helix-Schleife-Helix-Transkriptionsfaktor, PIF = PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR. Modifiziert nach Kazan und Manners (2012).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen und biochemischen Charakterisierung der calcium-abhängigen Proteinkinase CPK28 aus *Arabidopsis thaliana*. Zur Untersuchung der Proteinfunktion *in vivo* sollte eine ausführliche Analyse zweier T-DNA-Insertionslinien in der codierenden Sequenz der CPK28 erfolgen, die bei Voruntersuchungen im Labor einen identischen Sprosselongationsphänotyp ausgebildet hatten. Da nur für wenige Beispiele aus dem Feld der Calcium-Signalübertragung eine direkte Auswirkung auf entwicklungsspezifische Vorgänge in Pflanzen beschrieben ist, versprach die Charakterisierung der CPK28 und ihrer *in vivo*-Funktion einen interessanten Erkenntnisgewinn für das Zusammenwirken des eher auf kurzfristige Adaptationen ausgelegten Bereichs der Calcium-Signaltransduktion mit einem langfristigen Prozess wie der Pflanzenentwicklung. Zur Charakterisierung der *in vivo*-Funktion wurden T-DNA-Insertionslinien phänotypisch untersucht, der Einfluss verschiedener Pflanzenhormone und Lichtbedingungen analysiert und in Genexpressionsanalysen Veränderungen auf transkriptioneller Ebene beobachtet. Komplementationsexperimente mit CPK28-Proteinvarianten sollten Aufschluss über die Relevanz der Kinaseaktivität *in vivo* geben.

Eine weitere Aufgabe stellte die biochemische Charakterisierung der CPK28 mittels *in vitro*- und *in vivo*-Analysen unterschiedlicher Proteinvarianten dar. Der Einfluss von Calcium auf die Kinaseaktivität wurde ebenso untersucht wie die Relevanz bekannter *in vitro*-Auto-Phosphorylierungsstellen (Hegeman *et al.* 2006) für die Kinasefunktion.

Zur Identifikation eines möglichen *in vivo*-Substrates, das zur Aufklärung der zellulären Funktion der CPK28 beitragen könnte, wurden in Kooperation mit Dr. Joachim Uhrig an der Universität Köln in einer Hefe-2-Hybrid-Proteininteraktionsanalyse potentielle Interaktoren identifiziert. Diese sollten durch weiterführende Experimente genauer analysiert werden um einen möglichen funktionalen Zusammenhang zu CPK28 herzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzenmaterial

2.1.1.1. *Arabidopsis thaliana*

Für diese Arbeit wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) verwendet, die in Tabelle 2-1 näher charakterisiert sind. Alle T-DNA-Insertionslinien wurden mittels PCR (siehe 2.2.2.9.) bzw. Selektionsanalysen auf die entsprechenden T-DNA-Insertionen überprüft. Homozygote *knock-out*-(KO)-Pflanzen bzw. auf Proteinexpression getestete, transgene Linien wurden für die Versuche verwendet. Als Wildtyp-(WT)-Kontrolle diente in allen Versuchen die Linie Col-0. Die *cpk28-1* T-DNA-Insertionslinien dienten als Hintergrund für Komplementationslinien mit verschiedenen CPK28-Konstrukten, der Wildtyp diente als Hintergrund für *pCPK28::GUS*-Expressionslinien und *PP2C*-Überexpressionslinien. Wenn nicht anders vermerkt, beinhalten die angegebenen Konstrukte die codierende Sequenz (CDS) der entsprechenden Gene.

Tabelle 2-1: Verwendete Pflanzenlinien

Bezeichnung	Hintergrund	Linie	Mutagen	Quelle/Referenz
Wildtyp (WT) Columbia 0	Col-0	-	-	J. Dangl (University of North Carolina, Chapel Hill, USA)
<i>cpk28-1</i>	Col-0	GK-523B08	T-DNA	(Kleinboelting <i>et al.</i> 2012), Bezug von NASC
<i>cpk28-2</i>	Col-0	GK-061C04	T-DNA	(Kleinboelting <i>et al.</i> 2012), Bezug von NASC
<i>aos</i>	Col-0	SALK_017756	T-DNA	(Alonso <i>et al.</i> 2003) Bezug von NASC
<i>coi1-16</i>	Col-0	-	EMS	(Ellis und Turner 2002)
<i>pp2c</i>	Col-0	SALK_000296	T-DNA	(Umbrasaite <i>et al.</i> 2010) Bezug von NASC
WT Landsberg erecta (Ler)	Ler	-	-	AG Willmitzer, MPIMP Golm
<i>phyB</i>	Ler	-	EMS	AG Willmitzer, MPIMP Golm
<i>cry1</i>	Ler	-	EMS	AG Willmitzer, MPIMP Golm

Tabelle 2-2: Für diese Arbeit generierte Pflanzenlinien

Bezeichnung	Hintergrund	Promotor	Resistenz	Quelle/Referenz
35S::CPK28-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	Phosphino-tricin (PPT)	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-D188A-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-VK-YFP (CDS)	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-VK-D188A-YFP (CDS)	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-S228A-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-S228D-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-S318A-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-S318D-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-S495A-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-S495D-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
35S::CPK28-G2A-YFP	<i>cpk28-1</i>	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt
pCPK28::GUS	Col-0	pCPK28	PPT	AG Prof. Dr. Romeis, übernommen von J. Legen
pCPK28::CPK28-YFP	<i>cpk28-1</i>	pCPK28	PPT	AG Prof. Dr. Romeis, hergestellt von S. Werner
pKNAT1::CPK28-YFP	<i>cpk28-1</i>	pKNAT1	PPT	AG Prof. Dr. Romeis, hergestellt von S. Werner
pSUC2::CPK28-YFP	<i>cpk28-1</i>	pSUC2	PPT	AG Prof. Dr. Romeis, hergestellt von S. Werner
<i>cpk28-1</i> x aos (Kreuzung)	<i>cpk28-1</i>	-		in dieser Arbeit hergestellt
<i>cpk28-2</i> x aos (Kreuzung)	<i>cpk28-2</i>	-		in dieser Arbeit hergestellt
<i>cpk28-1</i> x <i>coi1-16</i> (Kreuzung)	<i>cpk28-1</i>	-		in dieser Arbeit hergestellt
35S::PP2C-YFP	Col-0	35S	PPT	in dieser Arbeit hergestellt

2.1.1.2. *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana-Blätter dienen der transienten Expression großer Proteinmengen zur biochemischen Charakterisierung oder subzellulären Lokalisation der untersuchten *Arabidopsis thaliana*-Proteine.

2.1.2. Bakterienstämme

In Tabelle 2-3 sind die verwendeten Bakterienstämme mit entsprechenden Genotypen aufgelistet.

Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Zweck
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	<i>E.coli</i> F ⁻ <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74</i> <i>recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galJ galK _-rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i> (Grant <i>et al.</i> 1990)	Amplifikation von Klonierungsvektoren
	DB3.1 TM	F ⁻ <i>gyrA</i> 462 <i>endA1 glnV44</i> Δ -(<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20 r_B⁻, m_B⁻ ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm ^r) <i>xyl5 Δleu mtl1</i> (Invitrogen)	Amplifikation leerer Gateway®-Vektoren
	BL21(DE3)	<i>E.coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal λ(DE3)</i> (Stratagen)	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3103:: pMP90RK	T-DNA ⁻ , Rif ^R , Gm ^R , Kan ^R (Koncz und Schell 1986)	Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i> , Expression mit β -Lactamase-Resistenz
	C58C1:: pCH32	C58C1, Rif ^R , Gm ^R (Voinnet <i>et al.</i> 2003)	Expression des p19 <i>silencing</i> -Inhibitorproteins
	GV2260	pGV2260 (pTiB6S3 Δ T-DNA)) in C58C1, Rif ^R , Carb ^R (Deblaere <i>et al.</i> 1985)	Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i> , Expression mit Kanamycin-Resistenz

2.1.3. Vektoren

2.1.3.1. Ausgangsvektoren

In der Tabelle 2-4 sind die Ausgangsvektoren für in dieser Arbeit hergestellte bzw. verwendete Plasmide aufgelistet.

Tabelle 2-4: Ausgangsvektoren

Vektor	Charakteristika	Verwendung
pENTR TM /D-TOPO® (Invitrogen)	ori pUC, M13 <i>fwd</i> und <i>rev</i> Oligonukleotid-Bindestellen, T7 Promotor, <i>rrnB</i> T1 und T2 <i>attL1, attL2, Kan^R,</i>	TOPO®-Vektor zum gerichteten Klonieren von PCR-Produkten
pJET1.2/blunt (Fermentas)	<i>ep</i> (pMB1), Amp ^R , <i>eco47IR, PlacUV5, T7 Promotor</i>	Blunt-End-Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten

Fortsetzung Tabelle 2-4

pXCS-HA-StrepII (Witte <i>et al.</i> 2004)	ori ColE1, ori RK2, P35S, pA35S, BASTA ^R , Hämagglutinin (HA), StrepII	binärer Vektor für C-terminale HA-Strep-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , Fusionsprotein unter transkriptioneller Kontrolle des CMV-Promotors (35S)
pXCSG-StrepII (Witte <i>et al.</i> 2004)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA ^R , StrepII	Gateway®-kompatibler binärer Vektor für C-terminale Strep-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pXNS2-StrepII (Cao <i>et al.</i> 2010)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA ^R , StrepII	binärer Vektor für N-terminale Strep-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pXCS-YFP (Feys <i>et al.</i> 2005)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA ^R , eYFP	binärer Vektor für C-terminale YFP-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pXCS-mCherry	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA ^R , mCherry	binärer Vektor für C-terminale mCherry-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor, AG Romeis, hergestellt von R. Lassig
pXCSG-YFP (Feys <i>et al.</i> 2005)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA ^R , eYFP	Gateway®-kompatibler binärer Vektor für C-terminale eYFP-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pXNS2-YFP	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA ^R , eYFP	binärer Vektor für N-terminale YFP-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor, AG Witte, hergestellt von K. Dahncke (unveröffentlicht)
pGEX-4T1 (GE Healthcare)	ori ColE1, amp ^R , protease cleavage site thrombin, ptac, GST, lac Iq	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor
pSPYCE(MR) (Waadt <i>et al.</i> 2008)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, C-Terminus von eYFP am N-Terminus der MCS	binärer Vektor für N-terminale YCE-Fusion für BiFC und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pSPYNE173 (Waadt <i>et al.</i> 2008)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, N-Terminus von eYFP am C-Terminus der MCS	binärer Vektor für C-terminale YNE-Fusion für BiFC und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor

2.1.3.2. Verwendete Vektoren

Die Tabellen 2-5 bis 2-7 listen in dieser Arbeit hergestellte bzw. verwendete Plasmide auf.

Tabelle 2-5: Arbeitsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle/Referenz
pENTRTM/D-TOPO®-CPK28-CDS	CPK28-CDS ohne Stopcodon, Vorlage zur Gateway®-Klonierung in pXCSG	AG Prof. Dr. Romeis
pENTRTM/D-TOPO®-CPK28-D188A-CDS	und zielgerichteten Punktmutagenese	

Tabelle 2-6: Vektoren zur Proteinexpression in Pflanzen

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle/Referenz
pXCSG-CPK28-WT-StrepII pXCSG-CPK28-WT-YFP pXCSG-CPK28-D188A-StrepII pXCSG-CPK28-D188A-YFP	Binärer Expressionsvektor für die CDS der CPK28, einschließlich der kinase-inaktiven Variante D188A, C-terminale Markierung unter Kontrolle des 35S-Promotors.	AG Prof. Dr. Romeis
pXCSG-CPK28-(gen)-VK-StrepII pXCSG-CPK28-D188A-(gen)-VK-StrepII pXCS-CPK28-VK-StrepII pXCS-CPK28-VK-YFP pXCS-CPK28-D188A-VK-StrepII	Binärer Expressionsvektor für CPK28-VK (Variable + Kinasedomäne), genomische Sequenz von Basenpaar 1 - 1783, C-terminale Markierung. Binärer Expressionsvektor für CPK28-VK (Variable + Kinasedomäne), CDS-Sequenz von Basenpaar 1-981, C-terminale Markierung.	AG Prof. Dr. Romeis in dieser Arbeit hergestellt
pXCS-CPK28-D188A-VK-YFP pXCSG-CPK28-S228A-StrepII pXCSG-CPK28-S228A-YFP pXCSG-CPK28-S228D-StrepII pXCSG-CPK28-S228D-YFP pXCSG-CPK28-S318A-StrepII pXCSG-CPK28-S318A-YFP pXCSG-CPK28-S318D-StrepII pXCSG-CPK28-S318D-YFP pXCSG-CPK28-S495A-StrepII pXCSG-CPK28-S495A-YFP pXCSG-CPK28-S495D-StrepII pXCSG-CPK28-S495D-YFP	Binärer Expressionsvektor für die Phosphorylierungsstellen-Varianten der CDS der CPK28, C-terminale Markierung.	in dieser Arbeit hergestellt
pXCSG-CPK28-G2A-StrepII pXCSG-CPK28-G2A-YFP	Binärer Expressionsvektor für die Myristoylierungsstellendeletion der CDS der CPK28, C-terminale Markierung.	in dieser Arbeit hergestellt
pXCSG-CPK32-WT-YFP	Binärer Expressionsvektor für CPK32, C-terminale Markierung.	AG Prof. Dr. Romeis
pXNS2-PP2C-YFP	Binärer Expressionsvektor zur Expression der PP2C, CDS, N-terminale Markierung.	in dieser Arbeit hergestellt (Bachelorarbeit K. Hake)
pXCS-CaS-YFP pXCS-Cys-YFP	Binärer Expressionsvektor zur Expression der putativen Interaktoren, CDS, C-terminale Markierung.	in dieser Arbeit hergestellt (K. Hake)
pSPYCE (MR)-PP2C	Binärer Expressionsvektor zur Interaktionsanalyse mittels BiFC, CDS, N-terminale Markierung unter Kontrolle des 35S-Promotors.	in dieser Arbeit hergestellt (K. Hake)
pSPYCE (M)-CaS pSPYCE (M)-Cys	Binärer Expressionsvektor zur Interaktionsanalyse mittels BiFC, CDS, C-terminale Markierung.	in dieser Arbeit hergestellt (K. Hake)
pSPYNE 173-CPK28	Binärer Expressionsvektor zur Interaktionsanalyse mittels BiFC, CDS, C-terminale Markierung.	in dieser Arbeit hergestellt (K. Hake)

Tabelle 2-7: Vektoren zur Proteinexpression in *E. coli*

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle/Referenz
pGEX-4T1-PP2C	Expressionsvektor zur rekombinanten in dieser Arbeit N-terminalen GST-PP2C-Expression, IPTG-Induktion, Ampicillinresistenz	hergestellt (K. Hake)

2.1.4. Chemikalien

Alle verwendeten Laborchemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders angegeben, von Applichem (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Bio-Rad (München), Fluka (St. Gallen, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien wurden von Difco Lab (USA) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen. Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bzw. Sigma-Aldrich synthetisiert. Sequenzierungen wurden von den Firmen GATC (Konstanz) bzw. Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen.

Tabelle 2-8: Verwendete Enzyme, Proteine, Antikörper und Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
5x DNA-Ladepuffer	Bioline (Luckenwalde)
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
BSA Bovines Serum Albumin, minimum 98 % Reinheit	Sigma (Steinheim)
Cellulase	Yakult (Japan)
DNase I, rekombinant, RNase-frei	Roche (Penzberg)
DNase, RNase-frei	Fermentas (St. Leon-Rot)
HyperLadder I	Bioline (Luckenwalde)
L-Glutathion, reduziert	Applichem (Darmstadt)
LR Clonase® II Enzyme mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Lysozym	Sigma (Steinheim)
Macerozym	Yakult (Japan)
MMLV, reverse Transkriptase M170	Promega (Mannheim)
PageRuler plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Pfu plus DNA-Polymerase	Roboklon (Berlin)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
Proteaseinhibitor-Mix E.coli (P8849)	Sigma (Steinheim)
Proteaseinhibitor Cocktail Pflanzen (P9599)	Sigma (Steinheim)
Restriktionsendonukleasen vom Typ II	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	Romeis-Labor (Berlin)
Trisure	Bioline (Luckenwalde)
Silwet L-77	Lehle Seeds (USA)
Strep-Tactin-AP-Konjugat	IBA (Göttingen)

Fortsetzung Tabelle 2-8

Strep-Tactin-HRP-Konjugat	IBA (Göttingen)
SuperscriptIII SuperMix	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-GFP (aus Maus)	Roche (Penzberg)
anti-HA (aus Ratte)	Roche (Penzberg)
anti-c-myc (aus Maus)	Roche (Penzberg)
anti-Maus IgG, AP-Konjugat	Sigma (Steinheim)
anti-Maus IgG, HRP-Konjugat	Sigma (Steinheim)
anti-Ratte IgG, AP-Konjugat	Sigma (Steinheim)

2.1.5. Nährmedien

Zu Selektionszwecken wurde den Medien aus Tabelle 2-9 nach Abkühlen auf ca. 55°C das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die jeweiligen Arbeitskonzentrationen können aus Tabelle 2-10 entnommen werden.

Tabelle 2-9: Verwendete Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
LB	1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,0 % (w/v) NaCl mit 1 M NaOH auf pH 7,0 einstellen
YEB	0,5 % (w/v) Fleischextrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 mM MgSO ₄ , mit 1 M NaOH auf pH 7,2 einstellen
0,5x MS	2,2 g/l MS-Salz (Duchefa); pH 5,7 mit KOH einstellen, Festmedium: Zugabe von 0,8 % Pflanzenagar (Duchefa)

Tabelle 2-10: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Carbenicillin	50 µg/ml
Gentamycin	15 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml (aus 25 mg/ml in Methanol)

2.1.6. Verwendete Computerprogramme

Sequenz- und Sequenzierungsdaten wurden mit Vector NTI (Invitrogen, Karlsruhe) bearbeitet. Die Analyse der Genexpression mittels quantitativer RealTime-PCR (qRT-PCR) wurde mit dem Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, München) durchgeführt. Hypocotylelongation wurde mit dem Analysewerkzeug Image J (NIH, USA) ausgewertet. Zur Auswertung und Generierung von Bilddateien der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Software Leica LAS AF Lite 2.6.0 (Leica Microsystems, Mannheim) genutzt. Statistische Analysen zu Wachstumsmerkmalen, qRT-Genexpression und *in vitro*-Kinaseexperimenten erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, USA).

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Anzucht von *E. coli*

E.coli-Kulturen wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (2.1.5.) herangezogen. Für Wachstum auf LB-Agar-Platten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Bakterien wurden auf Platten bei 37 °C über Nacht angezogen, die Anzucht in Flüssigkultur erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) ca. 12–16 h.

2.2.1.2. Hitzeschocktransformation chemokompetenter *E.coli*-Zellen

Ein 100 µl-Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde mit 20-50 ng DNA-Lösung (Plasmid) oder 2-5 µl eines Ligationsansatzes (2.2.3.3.) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte 45 s Hitzeschock bei 42 °C und sofortiges Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und ca. 30-45 min Inkubation unter Schütteln bei 37 °C wurden 1/10 bzw. 9/10 des Ansatzes auf LB-Agar Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3. Herstellung chemokompetenter *E.coli*-Zellen

200 ml X-Broth-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 0,4 % MgSO₄, 10 mM KCl, pH 7,6) wurde mit einer LB-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,03 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Zentrifugation erfolgte 10 min bei 2 000 × g und 4 °C, alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Bakterienpellet wurde in 60 ml Transformationspuffer I (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 8 ml Transformationspuffer II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,5) wurden jeweils 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.2.1.4. Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens-Kulturen wurden in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (2.1.5.) herangezogen. Für Wachstum auf YEB-Agar-Platten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Bakterien wurden auf YEB-Agar-Platten bei 28 °C 2-3 Tage angezogen, die Anzucht in Flüssigkultur erfolgte durch Inokulation mit mehreren Impfösen Bakterienmaterial bei 28 °C unter Schütteln (180 rpm) über 12–16 h.

2.2.1.5. Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Transformation von Agrobakterien wurden 40 µl elektrokompetente Zellen mit 100-250 ng Plasmid-DNA gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporations-Küvette gegeben und im MicroPulser Elektroporator (Bio-Rad, München) elektroporiert. Nach Zugabe von 0,5 ml YEB-Medium erfolgte Inkubation für 1 h bei 28 °C unter Schütteln. 5-10 µl des Transformationsansatzes wurden auf YEB-Agar mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.1.6. Herstellung chemokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

200 ml YEB ohne Antibiotikum wurden mit zwei 5 ml Übernachtskulturen (YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika) angeimpft und bei 28°C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Nach 5 min Kühlung auf Eis erfolgte Zentrifugation bei 3500 x g und 4°C für 20 min. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls auf Eis mit vorgekühlten Lösungen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 ml ddH₂O und nach erneuter Zentrifugation in 100 ml ddH₂O (4 °C) vorsichtig resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation wurde das Pellet in 8 ml 10 % kaltem Glycerin gewaschen und erneut in 8 ml 10 % kaltem Glycerin vorsichtig resuspendiert. 40 µl-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.7. Herstellung von Glycerinkulturen

Glycerinkulturen von *E. coli* oder *Agrobacterium tumefaciens* wurden unter sterilen Bedingungen in 1,5 oder 2 ml Schraubdeckelgefäßen hergestellt. Hierzu wurden 500 µl einer frischen Übernachtskultur steril entnommen, mit 500 µl Glycerinlösung (50 %) vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden – Nukleinsäuren

2.2.2.1. *E. coli*-Plasmid-DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab erfolgte mit dem GenJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben. Große Mengen Plasmid-DNA für die Protoplastentransfektion wurden nach Herstellerangaben mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in ddH₂O mit einer finalen Konzentration von ca. 2 µg/µl gelöst.

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

Genomische DNA wurde aus *A. thaliana* nach der Edwards-Methode isoliert. Gefrorenes Blattmaterial wurde in 300 µl Edwards-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 25 mM EDTA) in einer Retschmühle mit 4–8 Stahlkügelchen 2 min bei 25-30 Hz

zerkleinert. Nach Zugabe von 10 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung und gründlichem Vermischen wurden unlösliche Blattbestandteile bei 10 000 × g 3 min abzentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 200 µl Isopropanol gemischt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die gefällte DNA bei 10 000 × g 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 10 000 × g wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl ddH₂O aufgenommen. Ein 20 µl-Taq-PCR-Ansatz zur Genotypisierung enthielt 1 µl DNA-Lösung (2.2.2.9).

2.2.2.3. RNA-Isolierung aus *A. thaliana* nach Chomczynski und Sacchi (2006)

50-200 mg homogenisiertes Pflanzenmaterial wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen mit 1 ml Trisure (Bioline, Luckenwalde) versetzt, gut vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 × g wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 0,2 ml Chloroform versetzt und 15 s gut vermischt. 2-3 min Inkubation bei RT folgte Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 × g für 15 min zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 0,5 ml Isopropanol zur RNA-Fällung wurden zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 × g für 10 min wurde die RNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 4 °C und 7 500 × g zentrifugiert. Nach Trocknung des RNA-Pellets bei RT wurde dies in 30-50 µl RNase-freiem ddH₂O gelöst und anschließend 10 min bei 50-60 °C erhitzt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte wie unter 2.2.2.12. angegeben. Zur Qualitätsüberprüfung wurde 1 µl RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1 %-igem Gel aufgetrennt (Abschnitt 2.2.2.10.). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C, während der Bearbeitung wurde die RNA auf Eis gehalten.

2.2.2.4. DNase-Behandlung der RNA

Zu 20 µl RNA wurden 2 µl RNase-freie DNase (Fermentas, St. Leon-Rot) gegeben und bei 37 °C 60 min inkubiert. Durch finale Zugabe von 2 µl 50 mM EDTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C wurde die DNase irreversibel inaktiviert.

2.2.2.5. Überprüfung der RNA-Reinheit mit *realtime*-PCR (nur für qRT-PCR)

Vor der cDNA-Synthese für qRT-Experimente erfolgte die Überprüfung der RNA auf mögliche Kontamination mit genomischer DNA mit intronspezifischen Oligonukleotiden in einer *realtime*-PCR. Ein 10 µl-Ansatz enthielt 1 µl RNA, 5 µl 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) und je 0,5 µmol der beiden Oligonukleotide. Die PCR wurde mit dem Thermocycler Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, München)

entsprechend der Vorgaben des Power SYBR Green PCR Master Mix‘ durchgeführt (Tabelle 2-11). 1 µl genomische DNA diente als Positiv-Kontrolle.

Tabelle 2-11: PCR-Programm Power SYBR Green

Schritt	Temperatur	Zeit	
1: Denaturierung	95 °C	10 min	
2: Denaturierung	95 °C	15 s	}39x
3: Oligonukleotid-Bindung + Amplifikation	60 °C	60 s	
4: Dissoziationskurve	in 0,5 °C-Abständen	alle 2 s	

2.2.2.6. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für semi-quantitative RT-PCR (2.2.2.7.) erfolgte für 2 h bei 42 °C mit 1 µg DNase-behandelter RNA (Abschnitt 2.2.2.4). Der 25-µl-Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM dNTP-Mix (0,5 mM je dNTP), 5 µg oligo(dT)-Oligonukleotide und 200 U MMLV, reverse Transkriptase M170 (Promega, Mannheim). Zur Inaktivierung wurde der Reaktionsansatz bei 72 °C 15 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA konnte sofort für RT-PCR (2.2.2.7.) verwendet werden. Die cDNA-Synthese für quantitative *realtime*-PCR (qRT-PCR, 2.2.2.8.) erfolgte mit dem SuperscriptIII SuperMix (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Ein 20 µl-Reaktionsansatz enthielt 10 µl 2x RT Reaktionspuffer, 2 µl RT Enzymmix, 2 µg RNA sowie RNase-freies Wasser. Nach 10-minütiger Inkubation bei 25 °C erfolgte die reverse Transkription bei 50°C für 60-120 min. Inaktivierung der Reaktion wurde durch 5 min Inkubation bei 85 °C erreicht, danach wurde die cDNA auf Eis gekühlt. Nach Verdau der RNA mit 1 µl (2 U) *E. coli* RNase H bei 37 °C für 20 min wurde die cDNA 1:1 mit ddH₂O verdünnt und für qRT-PCRs eingesetzt.

2.2.2.7. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1 µl cDNA wurde in einem 20 µl-Taq-PCR-Ansatz (2.2.2.9.) zur Genexpressionsanalyse verwendet. Zur Abschätzung der cDNA-Konzentrationen wurde das Referenzgen *ACTIN2* genutzt und cDNA-Mengen unterschiedlicher Proben entsprechend der Bandenstärke der *ACTIN2*-PCR angepasst.

2.2.2.8. quantitative *realtime*-PCR (qRT-PCR)

Vor der Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR erfolgten Qualitätskontrollen der synthetisierten cDNA. Hierzu wurde die Expression von *ACTIN2* in einem 10 µl-Ansatz mit 1 µl verdünnter cDNA, 5 µl 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) und je 0,5 µmol der beiden Oligonukleotide mit 2 technischen Replikaten pro Probe überprüft. Die PCR wurde mit dem Thermocycler Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad,

München) durchgeführt (Programm siehe Tabelle 2-11). Nach Anpassung aller cDNAs auf einen *ACTIN2*-Cq-Wert von ca. 19,5 erfolgte die Überprüfung der Transkriptionseffizienz mit Oligonukleotiden für das *GAPDH* 3'-Ende bzw. *GAPDH* 5'-Ende. Nur cDNA mit einer Differenz kleiner als 1,5 zwischen 3'- und 5'-Cq-Wert wurde weiter analysiert.

Die Expression verschiedener Gene wurde mit je 1 µl cDNA wie im oben beschriebenen Ansatz mit entsprechenden Oligonukleotiden (siehe Anhang, Tabelle 6-6) durchgeführt. Pro Experiment wurden 3 biologische Replikate (je 2 Pflanzen) mit je 2 technischen Replikaten pro Genotyp analysiert. Die Spezifität der PCR-Reaktion wurde durch Analyse der PCR-Produkt-Dissoziationskurven überprüft. Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit dem Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, München) mit *ACTIN2* als Referenzgen.

2.2.2.9. Polymerase Chain Reaction (PCR) nach Mullis *et al.* (1986)

Die PCR diente der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus pflanzlicher cDNA, genomischer DNA oder Plasmid-DNA. Dabei wurden die DNA-Polymerasen Taq (laboreigene Herstellung), PfuPlus (Roboklon, Berlin) oder Phusion High-Fidelity (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Die Spezifität des Amplifikats wurde durch Oligonukleotide mit einer Länge von 20–33 Basenpaaren, am 3'- und 5'-Ende des gewünschten Amplifikats bindend, gewährleistet. Der 20 µl-Taq-PCR-Ansatz enthielt 1 µl Taq-DNA-Polymerase, 4 µl „5x Green GoTaq® Flexi Reaktionspuffer (Promega, Mannheim), 1,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP-Mix (0,25 mM je dNTP), 0,5 µM beider Oligonukleotide (0,25 µM je Oligonukleotid) und von der Anwendung abhängige variable Mengen DNA als Sequenzvorlage. Der 20 µl-Pfu- oder -Phusion-PCR-Ansatz enthielt 2,5 U DNA-Polymerase, 1x Reaktionspuffer, 1 mM dNTP-Mix (0,25 mM je dNTP), 0,5 µM beider Oligonukleotide (0,25 µM je Oligonukleotid) und 20 µg DNA-Vorlage. Tabelle 2-12 gibt den Ablauf eines PCR-Programms wieder.

Tabelle 2-12: PCR-Programm: ^xDie Temperatur der Oligonukleotid-Bindung für die einzelnen Reaktionen sind im Anhang in den Tabellen 6-1 bis 6-5 aufgelistet.

Schritt	Temperatur	Zeit
1: Denaturierung	95 °C	3 min
2: Denaturierung	95 °C	30 s
3: Oligonukleotid-Bindung	55–60 ^x °C	30 s
4: Amplifikation	72 °C	1 min/1000 bp (Taq) 30 s/1000 bp (Pfu/Phusion)
5: Amplifikation	72 °C	10 min

← 29-40x

2.2.2.10. Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von linearen DNA-Molekülen erfolgte in 1-2 %-igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA mit 28,55 % (v/v)

Eisessig, pH 8,5) mit 50 ng/ml Ethidiumbromid. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE verwendet. Zur Gelbeladung wurde die DNA mit 5x DNA-Ladepuffer (Bioline, Luckenwalde) versetzt, als Größenstandard diente Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde). Die angelegte Spannung lag je nach Elektrophoresekammer zwischen 80 V und 160 V. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

2.2.2.11. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden (aus Restriktionsansätzen bzw. PCR-Produkte für Klonierungen) wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit dem High Pure PCR Cleanup micro Kit (Roche, Penzberg) eluiert.

2.2.2.12. Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Spektrophotometer (Nanodrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen).

2.2.3. Klonierung

Die Tabellen 2-13 und 2-14 führen die während der vorliegenden Arbeit hergestellten Vektoren inklusive Klonierungsstrategie auf. Klonierungs-PCRs erfolgten entweder mit cDNA oder schon vorhandenen Plasmiden mit entsprechender CDS als Sequenzvorlage.

Tabelle 2-13: Restriktionsklonierungen

Ziel-Sequenz	Vektor	Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3') Restriktionsschnittstellen klein	Restriktionsschnittstellen	Bezeichnung Expressionsvektor
CPK28-VK bzw. CPK28- VK-D188A (amplifiziert aus pENTR- Vektoren)	pXCS- StrepII	CPK28 fwd	GGaagcttATGGGTGTCTGTTTC	<i>HindIII</i>	pXCS-CPK28- VK-StrepII oder YFP
	oder YFP	<i>HindIII</i> CPK28- VK rev		<i>SmaI</i>	bzw. pXCS-CPK28- VK-D188A- StrepII oder YFP
PP2C CDS (aus cDNA amplifiziert)	pXNS2- YFP	PP2C- fwd	AAgaattcATGACTAATAAACTTCGCTC	<i>EcoRI</i>	pXNS2-PP2C- YFP
		<i>EcoRI</i> PP2C rev	AAggtaccTCAGCCTTTGTAATGGTTG	<i>BamHI</i>	
CaS CDS (aus cDNA amplifiziert)	pXCS- YFP	CaS fwd	AAatcgatATGGCTATGGCGGAAATGG	<i>Clal</i>	pXCS-CaS- YFP
		<i>Clal</i> CaS rev	AAccggggGTCGGAGCTAGGAAGGAA	<i>SmaI</i>	
		<i>SmaI</i> CTTGG			

Fortsetzung Tabelle 2-13

Cys CDS (aus cDNA amplifiziert)	pXCS-YFP	Cys fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGATGATGAAGTCGTTGA TCTGTC	<i>Clal</i>	pXCS-Cys-YFP
		Cys rev <i>SmaI</i>	AAcccgggTAACGCCTTGAAAGACTCA AGGC	<i>SmaI</i>	
PP2C CDS (aus cDNA amplifiziert)	pSPYC E (MR)	PP2C- fwd <i>SalI</i>	AAgtcgacATGACTAATAAACTTCGCT CAGAAG	<i>SalI</i>	pSPYCE (MR)-PP2C
		PP2C rev <i>XhoI</i>	AActcgagTCAGCCTTTGTAATGGTTG AG	<i>XhoI</i>	
CaS CDS (aus cDNA amplifiziert)	pSPYC E (M)	CaS fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGGCTATGGCGGAAATGG C	<i>Clal</i>	pSPYCE (M)-CaS
		CaS rev <i>SmaI</i>	AAcccgggGTCGGAGCTAGGAAGGAA CTTGG	<i>SmaI</i>	
Cys CDS (aus cDNA amplifiziert)	pSPYC E (M)	Cys fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGATGATGAAGTCGTTGA TCTGTC	<i>Clal</i>	pSPYCE (M)-Cys
		Cys rev <i>SmaI</i>	AAcccgggTAACGCCTTGAAAGACTCA AGGC	<i>SmaI</i>	
CPK28 CDS	pSPYN E 173	CPK28 fwd <i>XbaI</i>	GCActctagaATGGGTGTCTGTTTCT CCGCC	<i>XbaI</i>	pSPYNE 173-CPK28
		CPK28 rev <i>SmaI</i>	TAcccgggTCGAAGATTCCTGTGA CCTGCA	<i>SmaI</i>	
PP2C CDS	pGEX-4T1	umkloniert aus <i>BamHI</i> und <i>SmaI</i>	aus pSPYCE (MR)-PP2C mittels Schnittstellen		pGEX-4T1-PP2C

Tabelle 2-14: Mutagenese-Reaktionen

PCR-Sequenzvorlage	Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5'-3') (Mutation fettgedruckt)	Bezeichnung Zwischenvektor	Bezeichnung Expressionsvektor
pENTRTM/D-TOPO[®]-CPK28-CDS	CPK28 S228A fwd	CCATGACATTGTTGGT G CCGCCTATTATGTGG	pENTR TM /D-TOPO [®] -CPK28-S228A-CDS	pXCSG-CPK28-S228A-StrepII oder YFP
	CPK28 S228D fwd	CCATGACATTGTTGGT G ACGCCTATTATGTGG	pENTR TM /D-TOPO [®] -CPK28-S228D-CDS	pXCSG-CPK28-S228D-StrepII oder YFP
	CPK28 S318A fwd	CTGCTGCACAAGCACTAG C ACATGCGTGGGT TAGAG	pENTR TM /D-TOPO [®] -CPK28-S318A-CDS	pXCSG-CPK28-S318A-StrepII oder YFP
	CPK28 S318D fwd	CTGCTGCACAAGCACTAG A CCATGCGTGGGT TAGAG	pENTR TM /D-TOPO [®] -CPK28-S318D-CDS	pXCSG-CPK28-S318D-StrepII oder YFP
	CPK28 S318A rev	CTCTAACCCACGCATGTG C TAGTGCTTGTGCA GCAG		
	CPK28 S318D rev	CTCTAACCCACGCATGTG T C TAGTGCTTGTGCA GCAG		

Fortsetzung Tabelle 2-14

pENTR™ /D- TOPO®- CPK28- CDS	CPK28	GAGATGGGAAAATAGCCCTGCATGAGTTCAG	pENTR™/ D-TOPO®- CPK28- S495A- CDS	pXCSG- CPK28- S495A-StrepII oder YFP
	S495A			
	fwd			
	CPK28	CTGAACTCATGCAGGG G CTATTTTCCCATCTC		
	S495A			
	rev			
	CPK28	GAGATGGGAAAATAG A CCTGCATGAGTTCAG	pENTR™/ D-TOPO®- CPK28- S495D- CDS	pXCSG- CPK28- S495D-StrepII oder YFP
	S495D			
	fwd			
	CPK28	CTGAACTCATGCAGG T CTATTTTCCCATCTC		
	S495D			
	rev			
CPK28		pENTR™/ D-TOPO®- CPK28- S495D- CDS	pXCSG- CPK28- S495D-StrepII oder YFP	
G2A fwd	CCCTTCACCATGG G CTGTCTGTTTCTCCG			
CPK28				
G2A rev	CGGAGAAACAGACAG C CCATGGTGAAGGG			

2.2.3.1. Restriktionsverdau von Plasmiden

Der Verdau der Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Die Enzyme wurden im dazugehörigen Puffer nach Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die im 20 µl-Reaktionsansatz verwendete Plasmid-DNA-Menge betrug zwischen 300 und 1000 ng. Inkubation mit 0,3-0,5 µl Enzym erfolgte mindestens 1 h bei 37 °C, anschließend wurde das Enzym den Herstellerangaben entsprechend inaktiviert.

2.2.3.2. Dephosphorylierung

Bei Klonierungen mit kompatiblen Enden im Vektor wurden zur Vermeidung der Religation ohne DNA-Insert die 5'-Enden des geschnittenen, über Gelelektrophorese isolierten Plasmids dephosphoryliert. Dies erfolgte mit der Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) für 30-60 min bei 37 °C. Durch Inkubation der Proben für 5 min bei 65 °C wurde die Phosphatase inaktiviert.

2.2.3.3. Ligation

Ein 10 µl-Ligationsansatz enthielt 1 µl 10x Ligasepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl T4-DNA-Ligase sowie restriktionsverdaute Vektor- und Insert-DNA. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:1 bis 1:3, und es wurden zwischen 20 und 50 ng Vektor eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 22 °C.

2.2.3.4. Gateway®-Klonierung

Zur Klonierung von Genen mittels des ENTRY-Vektors pENTR™/D-TOPO® in unterschiedliche binäre Expressionsvektoren wurde das Gateway®-System von Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde das gewünschte Konstrukt, inklusive CACC-Sequenz vor dem Start-Codon, mittels PCR amplifiziert und in

pENTR™/D-TOPO® in gezielter Orientierung ligiert. Die Übertragung des Inserts in den Ziel-Vektor erfolgte über eine LR-Reaktion nach Angaben des Herstellers (LR Clonase® II Enzyme mix, Invitrogen, Karlsruhe). Transformation von 2-5 µl Reaktionsansatz erfolgte in *E. coli* DH10B.

2.2.3.5. Mutagenese-PCR nach Weiner *et al.* (1994)

Die gezielte Einführung von Punktmutationen mittels PCR diente der Untersuchung von Phosphorylierungs-Varianten der CPK28. Die Mutagenese-Oligonukleotide waren 28-36 bp lang und die zur Sequenzvorlage auftretende Falschpaarung befand sich in der Mitte des Oligonukleotids. Ein 50 µl-Pfu-PCR-Ansatz enthielt 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase, Pfu-Reaktionspuffer (Roboklon, Berlin), 0,48 mM dNTP-Mix (0,12 je dNTP), 0,5 µM beider Oligonukleotide (0,25 µM je Oligonukleotid) und 20-50 ng Plasmid-Vorlage. Das Programm für die Mutagenese-PCR ist in Tabelle 2-15 dargestellt.

Tabelle 2-15: Programm für zielgerichtete Mutagenese-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1: Denaturierung	95 °C	3 min
2: Denaturierung	95 °C	30 s
3: Oligonukleotid-Bindung	56 °C	30 s
4: Amplifikation	68 °C	1 min/1000 bp
5: Amplifikation	68 °C	10 min

} 18-20x

Die DNA wurde nach der PCR mit 10 U des Restriktions-Enzyms *DpnI*, welches nur methylierte DNA erkennt und schneidet, für 1 h bei 37 °C inkubiert. 3 µl des *DpnI*-behandelten PCR-Ansatzes wurde in DH10B transformiert.

2.2.3.6. Sequenzierung der DNA

Sequenzierung von 300–600 ng Plasmid-DNA oder ca. 30 ng PCR-Produkt erfolgte bei GATC (Konstanz) oder SeqLab (Göttingen).

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Proteinbiochemie - *E. coli*

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

Die die Protein-Expressionsvektoren enthaltenden BL21-(DE3)-Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C angezogen. Eine 5 ml-Übernachtskultur mit Antibiotika diente zur Inokulation der 50-100 ml-LB-Hauptkultur mit

Antibiotika auf eine OD₆₀₀ von 0,03, welche bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5–0,6 inkubiert wurde. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe des synthetischen Laktose-Analogons IPTG mit einer finalen Konzentration von 1 mM. Die induzierte Kultur wurde bei 28 °C und 180 rpm 2-3 h geschüttelt. Die Pelletierung der Bakterien erfolgte bei 3000 × g und 4 °C für 15 min. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Bakterienpellets bei –20 °C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

2.2.4.1.2. Zellaufschluss von *E. coli*

Der Zellaufschluss von *E. coli* erfolgte in 1 ml Lysepuffer pro 20 ml IPTG-induzierter Kultur. Das gefrorene Zellpellet wurde im GST-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 % (v/v) TritonX-100, 1 mM DTT, 1:200 Proteaseinhibitor-Mix für *E.coli*-Zellextrakt (P8849, Sigma, Steinheim)) resuspendiert. Anschließend wurden 0,02 g Lysozym und 15 µg/ml DNaseI (Roche, Penzberg) zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde 3x 10 s auf Eis bei Stufe 2–3 sonifiziert (Branson Sonifier®, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 × g abgetrennt und der Überstand, der Rohextrakt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.4.1.3. GST-Aufreinigung

Die GST-markierten Proteine wurden über Affinitätschromatografie mit dem GST Bind Resin Kit (Novagen, Darmstadt) aufgereinigt. Für 1 ml *E. coli*-Rohextrakt wurden 100 µl GST Bind Resin (50 % Suspension im GST-Lysepuffer) verwendet. Der Ansatz inkubierte auf dem Rotationsrad mit 20 rpm über 2 h bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf leere Bio Spin-Säulen (Bio-Rad, München) überführt und 5x mit je 2 ml GST-Lysepuffer gewaschen. Die weitere Bearbeitung für *in vitro-pulldown*-Experimente wird unter 2.2.6.2 beschrieben.

2.2.4.2. Proteinbiochemie – Pflanzen

2.2.4.2.1. Transiente Expression in *N. benthamiana*-Blättern

Proteinexpression in Pflanzen erfolgte agrobakterium-vermittelt in *N. benthamiana*. Dafür wurden Glycerin-Dauerkulturen der Agrobakterien (GV3103::pMP90RK für amp-Plasmide, GV2260 für kan-Plasmide) mit dem gewünschten Expressionskonstrukt auf YEB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert. 10-20 ml YEB-Flüssigkultur wurden dicht mit Agrobakterien angeimpft und etwa 16 h bei 28 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Zusätzlich wurde ein *A. tumefaciens*-Stamm, den *silencing*-Inhibitor p19 (Voinnet *et al.* 2003) exprimierend, angeimpft. Die Übernachtskulturen wurden bei 3000 × g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in

Infiltrations-Puffer (10 mM MES, 10 mM MgCl₂, 150 µM Acetosyringon) vorsichtig resuspendiert. Die OD₆₀₀ für jedes Expressionskonstrukt wurde auf 0,5 eingestellt und gemeinsam mit dem p19-Stamm mit einer OD₆₀₀ von 0,3 in 5-10 ml Puffer für 2 h bei RT inkubiert. Mit Hilfe einer 1 ml-Spritze wurden die Bakterien durch einen Rasierklingenschnitt in den apoplastischen Raum von *N. benthamiana*-Blättern ca. fünf Wochen alter Pflanzen infiltriert. Nach 2-5 Tagen wurden Blattproben zur weiteren Analyse im flüssigen Stickstoff weggefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2.2. Transiente Expression in *A. thaliana*-Protoplasten

Isolierung der Protoplasten erfolgte mit der „Tape-*Arabidopsis* Sandwich“-Methode nach Wu *et al.* (2009). Die Protoplastentransfektion wurde weitgehend wie bei Yoo *et al.* (2007) beschrieben durchgeführt. Alle Schritte erfolgten, falls nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur.

Rosettenblätter 9-11 von 4-5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit der Blattoberseite auf dem Klebefilm Time tape® (Time Med, USA) fixiert. Die Blattunterseite wurde mit dem Klebefilm Magic tape® (3 M, USA) bedeckt, sodass sich das Blatt zwischen den zwei Klebefilmen befand. Durch Entfernen des Magic tape® wurde die Epidermis der Blattunterseite abgezogen. 6-9 auf dem Time tape®-fixierte Blätter ohne untere Epidermis inkubierten 60–90 min unter leichtem Schütteln (40 rpm auf einem Horizontalschüttler) in 6 ml Enzymlösung (20 mM MES (pH 5,7), 0,4 M Mannitol, 20 mM KCl, 1,5 % Cellulase, 0,4 % Macerozym für 10 min bei 55 °C inkubiert, dann auf RT abgekühlt und 10 mM CaCl₂ und 0,1 % BSA zugegeben).

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 6 ml W5 (2 mM MES (pH 5,7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl) gestoppt. Nach Filtration durch einen Nylonfilter mit 80 µm Porengröße (Neolab, Heidelberg) wurden die Protoplasten durch Zentrifugation bei 100 × g 1 min pelletiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in W5-Lösung aufgeschüttelt und die Konzentration intakter Protoplasten in W5 auf 2×10⁵/ml eingestellt. Ermittlung der Protoplastendichte erfolgte am Lichtmikroskop (×16) mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die in W5 gelösten Protoplasten inkubierten 30 min auf Eis, wobei sie sich nach ca. 15 min durch die Schwerkraft am Boden des Inkubationsgefäßes absetzten. Die sedimentierten Protoplasten wurden in MMG-Lösung (4 mM MES (pH 5,7), 0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂) aufgenommen (Zellichte: 2×10⁵/ml). Pro Transfektion wurden 10 µg Plasmid-DNA pro Konstrukt, 100 µl Protoplastensuspension und 110 µl PEG-Transfektionslösung (30 % (w/v) PEG, 0,2 M Mannitol, 100 mM CaCl₂) verwendet. Der Transfektionsansatz wurde nach 10 min Inkubation durch Zugabe von 440 µl W5 abgestoppt und anschließend bei 100 × g 1 min zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 1 ml WI (4 mM MES (pH 5,7), 0,5 M Mannitol, 20 mM KCl) aufgenommen und inkubierten

über Nacht 16-20 h in mit 5 % (v/v) Kälberserum beschichteten 6x-Zellkulturschalen. Ernte erfolgte durch 2x Zentrifugation der Ansätze in 1,5 oder 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 10 000 × g für 5 s. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann direkt verwendet oder bei –80 °C gelagert.

2.2.4.2.3. Proteinextraktion nach transienter Expression in *N. benthamiana*

0,5 g *N. benthamiana*-Blattmaterial (2.2.4.2.1.) wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und 1 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 µg/ml Antipain und 2 µg/ml Leupeptin), 1:200 Proteaseinhibitor Cocktail (P9599, Sigma, Steinheim), 10 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM β-Glycerolphosphat, 100 µg/ml Avidin, 0,5 % (v/v) TritonX-100) zugegeben. Nach vollständigem Auftauen der Proben wurden diese bei 16 000 × g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand (Rohextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis weiterbearbeitet. YFP-Proteinextrakt wurde zum Proteinnachweis nach Konzentrationsbestimmung (2.2.4.3.) direkt für die SDS-PAGE (2.2.4.4.) oder für *in vitro*-Interaktionstests verwendet (2.2.6.2.), StrepII-markiertes Protein wurde meist affinitäts-gereinigt (2.2.4.2.6.) und in *in vitro*-Kinaseaktivitätsexperimenten (2.2.5.1.) eingesetzt.

2.2.4.2.4. Proteinextraktion nach transienter Expression in *A. thaliana*-Protoplasten

Das Protoplastenpellet wurde durch Zugabe von 100 µl Proteinextraktionspuffer (siehe 2.2.4.2.3.) pro Ansatz lysiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde bei 16 000 × g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand (Rohextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis weiterbearbeitet. StrepII-markiertes Protein wurde affinitäts-gereinigt (2.2.4.2.6.) und massenspektrometrisch analysiert (2.2.4.9.)

2.2.4.2.5. Proteinextraktion stabil-transformierter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

100-300 mg *Arabidopsis*-Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und 0,2-0,6 ml Proteinextraktionspuffer (2.2.4.2.3.) zugegeben. Nach vollständigem Auftauen der Proben wurden diese bei 16 000 × g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis weiterbearbeitet. YFP-Proteinextrakt wurde zum Proteinnachweis nach Konzentrationsbestimmung (2.2.4.3.) und –angleich direkt für die SDS-PAGE (2.2.4.4.) verwendet.

2.2.4.2.6. StrepII-Affinitätschromatografie

Zur Anreicherung StrepII-markierter Proteine wurde der Rohextrakt 1:40 (v/v) mit Strep-Tactin Macrorep (50 % Suspension, IBA, Göttingen) versetzt. Der Ansatz inkubierte in

1,5 bzw. 2 ml-Reaktionsgefäßen auf einem Rotationsrad bei 20 rpm 30 -120 min bei 4 °C. Pelletierung der Probe erfolgte bei 700 × g und 4 °C für 1 min. Die sedimentierte Strep-Tactin-Matrix mit gebundenem Protein wurde in 500-1000 µl Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100) aufgenommen und erneut bei 700 × g 1 min zentrifugiert, dieser Schritt wurde 4x wiederholt. Final wurde die Strep-Tactin-Matrix je nach Ansatzgröße entweder in 50-200 µl Waschpuffer resuspendiert und weiterbearbeitet. Alternativ wurde SDS-Probenpuffer zugegeben und durch 5 min Inkubation bei 95 °C wurden die an die Strep-Tactin-Matrix gebundenen Proteine für die SDS-PAGE in Lösung gebracht.

2.2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben. 10 µl einer BSA-Standardreihe von 0,05–0,50 mg/ml bzw. 10 µl unverdünnte sowie 1:2 bzw. 1:10 verdünnte Proben wurden mit 200 µl 1:5 verdünnter Bio-Rad Protein Assay®-Färbelösung versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt.

2.2.4.4. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

In dieser Arbeit wurden 10–12 %-ige Trenngele, entsprechend dem Molekulargewicht der untersuchten Proteine, und 5 %-ige Sammelgele mit dem Mini-SDS-Gel-System von Bio-Rad (München) verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit 20 % 5 × SDS-Probenpuffer (300 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % Glycin, 10 % (w/v) SDS, 500 mM DTT, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und anschließend bei 95 °C 5 min inkubiert. Als Puffer wurde Elektrophorese-Laufpuffer (50 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerol, 1 M DTT) verwendet, der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) diente als Größenstandard. Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 80-100 V im Sammelgel und von 160 V im Trenngel.

Tabelle 2-16: Zusammensetzung Trenngel-Sammelgel

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

Weitere Bearbeitung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte durch deren direkte Färbung mit Coomassie (2.2.4.5.) oder durch Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Western Blot (Abschnitt 2.2.4.6.).

2.2.4.5. Coomassie-Färbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte 20 min in Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie brillant-blau R-250, 45,45 % (v/v) Methanol, 10 % Eisessig) auf einem Horizontalschüttler bei 120 rpm. Anschließend wurden die Gele mehrere Stunden mit Entfärbelösung (5 % (v/v) Methanol, 9 % Eisessig) entfärbt.

2.2.4.6. Western Blot

Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond™-ECL®; GE-Healthcare, Solingen) erfolgte mit dem mini-PROTEAN R-System (Bio-Rad, München). Das Gel und die Membran wurden beidseitig von Whatman-Papier und einem Schwamm umschlossen. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 V oder für 14-16 h bei 40 V im Transferpuffer (48 mM Tris (pH 9,2), 39 mM Glycin, 0,43 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol).

2.2.4.7. Färbung von Membranen mit Ponceau-S

Die Ponceau-S-Färbelösung wurde zum reversiblen Anfärben von Proteinen auf Blot-Membranen verwendet. Die Membran inkubierte unter leichtem Schwenken 5 min in Ponceau-S-Färbelösung (0,1 % (w/v) Ponceau-S 5 % Essigsäure) und wurde dann mit ddH₂O entfärbt.

2.2.4.8. Immunodetektion

Nach dem Western Blot bzw. der Ponceau-S-Färbung wurde die Membran 1 h in 20 ml Blockierlösung (5 % Milchpulver in 1x TBS-T-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20)) blockiert und anschließend 2x 5 min mit je 10 ml TBS-T-Puffer gewaschen.

Die Detektion StrepII-markierter Proteine erfolgte mit dem Strep-Tactin HRP-(*horse radish peroxidase*)- oder -AP-(Alkalische Phosphatase)-Konjugat (IBA). Hierzu wurde, nach 10 min Vorinkubation mit 10 ml 2 µg/ml Avidin in TBS-T, das jeweilige Strep-Tactin-Konjugat 1:5000 direkt in die Lösung zugegeben und 1 h bei RT oder 16 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 3x 10 min mit TBS-T und im Fall des HRP-Konjugats zusätzlich 2x 10 min mit TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl) gewaschen. Detektion der enzymatischen Reaktion erfolgte für das HRP-Konjugat mittels ECL (SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA) und der Kodak Image Station 440CF. Detektion der AP-Reaktion erfolgte in 10 ml AP-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) und 66 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF) als Substrate der Alkalischen Phosphatase. Zum Nachweis von YFP-Protein wurde die Membran nach der Blockierung mit 10 ml TBS-T mit 1:10 000 anti-GFP IgG (Roche, Penzberg) als erstem Antikörper 1 h bei RT

oder 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach 3x Waschen in TB S-T für je 10 min erfolgte Inkubation mit 10 ml TBS-T 1: 20 000 anti-Maus IgG AP- oder HRP-Konjugat (Sigma, Steinheim) 1 h bei RT oder 16 h bei 4 °C. Detektion der Enzymaktivitäten wurde je nach gekoppeltem Enzym wie im Fall der StrepII-Proteindetektion beschrieben durchgeführt.

2.2.4.9. Massenspektrometrische Untersuchung der *in vivo*-Phosphorylierung

Für die Identifizierung von *in vivo*-Phosphorylierungsstellen wurden die StrepII-markierten Proteine transient in aus *cpk28-1* stammenden *Arabidopsis*-Mesophyllzellprotoplasten exprimiert (2.2.4.2.2.) und affinitätschromatographisch gereinigt (2.2.4.2.6.). Pro Proteinkonstrukt wurde ein 10x-Ansatz aufgereinigt und die Proteinaufreinigung mit 1/10 des Proteins mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Als Waschpuffer nach Immobilisierung wurde hier 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 10 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM β-Glycerol-phosphate und 0,05 % TritonX-100 verwendet.

Nach Umpufferung der gereinigten, immobilisierten Proteine in 200 µl 100 mM Bicarbonat erfolgte Alkylierung der Cysteine in 10 mM DTT in 100 mM Bicarbonat für 45 min bei 56 °C mit anschließender Inkubation in 55 mM Iodacetamid in 100 mM Bicarbonat für 30 min im Dunkeln. Die Strep-Tactin-Matrix wurde anschließend 2x mit 200 µl 100 mM Bicarbonat gewaschen und bei 37 °C über Nacht in 40 µl 10 µg/ml Trypsin in 50 mM Bicarbonat verdaut. Die Verdauungslösung wurde durch mehrfache Zentrifugation bei 700 x g für 1 min und Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß von der Strep-Tactin-Matrix getrennt und anschließend bei 30°C bis zur Trockne einrotiert.

Tryptische Peptide wurden mittels *selected reaction monitoring* (SRM) durch Nanoflow-HPLC (Proxeon Biosystems, www.proxeon.com) und einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer (MS, TSQ Quantum Discovery Max, Thermo Scientific) analysiert. Die MS-Analyse wurde von Prof. Dr. Waltraud Schulze am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm durchgeführt.

2.2.4.10. Bestimmung des Anthocyangehalts

Der Anthocyangehalt von Pflanzenmaterial wurde bestimmt wie bei Neff und Chory (1998) beschrieben. Ca. 100 mg homogenisiertes Pflanzenmaterial wurden über Nacht in 1 ml 80 % Methanol mit 5 % HCl bei 4 °C im Dunkeln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 14 000 x g für 20 min und Überführung des Überstands in neue Reaktionsgefäße wurde dessen Absorption bei den Wellenlängen $\lambda = 535$ (Anthocyan) und $\lambda = 657$ (Chlorophyll) mit einem Multiskan GO Spektrophotometer (Thermo Scientific, Karlsruhe) photometrisch vermessen. Die Berechnung des Anthocyangehalts erfolgte mit der Formel $[A_{535} - 0.25 \times A_{657} / \text{g Frischgewicht}]$.

2.2.4.11. Bestimmung des Ligningehalts

Die Bestimmung des Gesamtligningehalts wurde durchgeführt wie bei Hossain *et al.* (2012) beschrieben. Zellwandmaterial (CWR) wurde durch jeweils 3x Extraktion von komplett getrocknetem, homogenisiertem Pflanzenmaterial in Toluol/Ethanol 2:1 (v/v), 95 % Ethanol bzw. ddH₂O und anschließender Trocknung bei 70 °C für 18 h hergestellt. Die nachfolgende Analyse wurde durchgeführt wie bei Brinkmann *et al.* (2002) beschrieben. Aliquots von 2-10 mg CWR (3 Replikate pro Probe) wurden mit 1,5 ml 2 N HCl und 0,3 ml Thioglykolsäure vermischt und unter wiederholtem Invertieren 4 h bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis und Zentrifugation für 10 min bei 15 000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet 3x mit 1 ml ddH₂O gewaschen. Der Zugabe von 1 ml 0,5 N NaOH folgten 18 h Inkubation auf einem Horizontalschüttler (40 rpm) bei RT. Danach wurde 10 min bei 15 000 x g bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml-Gefäß überführt. Das Pellet wurde nochmals in 0,5 ml 0,5 N NaOH resuspendiert und zentrifugiert, der entstehende Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und mit 0,3 ml konzentrierter Salzsäure vermischt. Zur Präzipitation der Lignothioglykolat-Derivate wurden die Proben 4 h bei 4 °C inkubiert, anschließend 10 min bei 15 000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 0,5 N NaOH gelöst und die Absorption der Lösung bei $\lambda = 280$ nm bestimmt. Der relative Ligningehalt wurde im Verhältnis zur Wildtyp-Probe (=100 %) berechnet.

2.2.5. Enzymaktivitätsmessungen

2.2.5.1 *in vitro*-Kinaseaktivitätsmessung

Die Phosphorylierung von Syntide 2 oder unterschiedlichen Standardpeptiden aus *Arabidopsis thaliana* durch CPK28 und deren Proteinvarianten wurde mit der P81-Filter-Binde-Methode untersucht, wie bei Romeis *et al.* (2001) beschrieben.

Affinitäts-gereinigte StrepII-Proteine wurden bis zur Bestimmung der Proteinmengen über Nacht bei 4 °C in Waschpuffer (2.2.4.2.6.) gelagert und vor dem *in vitro*-Kinaseexperiment in Puffer E (50 mM HEPES (pH 7,4), 2 mM DTT, 0,1 mM EDTA) transferiert. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot bestimmt und entsprechend in die Reaktion eingesetzt.

Ein *in vitro*-Kinase-Reaktionsansatz (25 μ l) enthielt neben 2-10 μ l an der Strep-Tactin-Matrix immobilisiertem Protein 35 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 1,4 mM DTT, 0,07 mM EDTA, 10 μ M ATP, 3 μ Ci [γ -³²P]-ATP, 5 mM EGTA und unterschiedliche Konzentrationen CaCl₂. Als Substrat wurde 10 μ M Syntide 2 (Calbiochem, Darmstadt) oder unterschiedliche Standardpeptide eingesetzt. Die *A. thaliana*-Standardpeptide (ACA2 (RFTANLSKRYEAA), ACS6 (QSNLRLSFS~~D~~TRRF), RBOHD-1 (FFRSTSSRIKNA) und RBOHD-2 (LRRVFSRPRSK)) wurden entsprechend bekannter, putativer CDPK-

Substratsequenzen entworfen und von der Firma Eurogentec (Köln) synthetisiert. Die Berechnung definierter freier Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgte mit der *WEBMAXC extended-Website* (<http://www-leland.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcE.htm>). Für berechnete Konzentrationen an freiem Ca^{2+} von 50 nM, 500 nM, 5 μM , 50 μM bzw. 500 μM wurden entsprechend 1,66 mM, 4,11 mM, 4,90 mM, 5,07 mM oder 5,57 mM CaCl_2 zum Reaktionsansatz gegeben.

Die Reaktion wurde 20 min (oder wie im Zeitkurs angegeben) bei 30 °C durchgeführt und durch Zugabe von 3 μl 10 %-iger Phosphorsäure gestoppt. 20 μl jeder Reaktion wurden auf P81-Scheiben aufgetropft und bei RT getrocknet. Danach folgten 3 Waschschriffe mit 1 % Phosphorsäure um freies [γ - ^{32}P]-ATP zu entfernen. Radioaktiv-markiertes Substrat wurde in 200 μl Szintillationsflüssigkeit nach 30 min Inkubation in einem Hidex Plate Chameleon 425–104 Multilabel Counter detektiert.

2.2.6. Interaktionsstudien

2.2.6.1. BiFC

Transiente Koexpression von je 2 BiFC-Konstrukten erfolgte in ca. 5 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen durch Infiltration mit Agrobakterien GV2260 mit BiFC-Konstrukten (OD_{600} 0,5 pro Konstrukt) zusammen mit dem p19-Stamm (OD_{600} 0,3). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte wie unter 2.2.7.6., die Aufnahmen der unterschiedlichen Koexpressionsansätze erfolgten zum Vergleich der Fluoreszenzstärke immer unter den gleichen Einstellungen. Auswertung und Generierung von Bilddateien wurden mit der Software Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems, Mannheim) durchgeführt.

Detektion der BiFC-Proteinexpression mittels Western Blot und Immunodetektion erfolgte wie unter 2.2.4.8. beschrieben, wobei als 1. Antikörper für YCE-Proteine der anti-HA-Antikörper (1:10 000, Roche (Penzberg)) und als 2. Antikörper anti-Ratte-AP (1:10 000, Sigma (Steinheim)) eingesetzt wurden. Nachweis für YNE-Proteine erfolgte mit anti-c-myc (1:10 000, Roche (Penzberg)) als 1. und anti-Maus-AP (1:20 000, Sigma (Steinheim)) als 2. Antikörper.

2.2.6.2. *in vitro*-pulldown-Experiment

Die GST-Aufreinigung der rekombinanten GST-Proteine erfolgte wie unter 2.2.4.1.3. beschrieben. Proteinextraktion aus 1 g Blattmaterial der CPK-YFP-Proteinexpression in *N. benthamiana* wurde wie unter 2.2.4.2.3. beschrieben durchgeführt.

Zum *in vitro*-Interaktionstest wurde je 1 ml des Pflanzen-Rohextrakts auf die Säulen mit immobilisiertem, aufgereinigtem GST-Protein als Negativkontrolle gegeben. Der Durchlauf des Pflanzenrohextrakts wurde in einem sauberen Reaktionsgefäß aufgefangen und

weitere 2x auf die Säule gegeben, um möglichst vollständige Proteininteraktion zu erlauben. Das Waschen der GST-Matrix erfolgte 5x mit je 1 ml kalten GST-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,2 % (v/v) Nonidet-P40, 1 mM AEBSF). Zur Elution der GST-Proteine mitsamt der mutmaßlichen Interaktoren wurden 3x je 50 µl Elutionspuffer (250 mM Tris (pH 8,0), 100 mM Glutathion) auf die Säule gegeben und die einzelnen Eluatfraktionen in neuen Reaktionsgefäßen gesammelt. Detektion der Expression bzw. Interaktion erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der GST-Proteine (2.2.4.5.) bzw. Immunodetektion der YFP-Proteine (2.2.4.8) nach Western Blot in den unterschiedlichen Fraktionen.

2.2.7. Methoden zur Arbeit mit Pflanzen

2.2.7.1. Pflanzenanzucht

2.2.7.1.1. *Arabidopsis thaliana*-Anzucht

Pflanzen wurden entweder unter Langtag- (LD, 16 h Licht/8 h Dunkelheit) oder Kurztagbedingungen (SD, 8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei 22°C, einer Lichtmenge von ~150 µmol/m²s und ca. 55 % Luftfeuchtigkeit kultiviert, falls nicht anders angegeben im Wachstumsschrank Percival AR-66L/SPLIT mit Tageslichtlampen (*cool white fluorescent lamps*, Philips F17T8/TL741). Die Aussaat erfolgte auf Jiffy7-Erde (Jiffy Products, Norwegen) mit Überführung der einzelnen Pflanzen auf Mischerde (42,42 % (w/w) Einheitserde P, 42,42 % (w/w) Einheitserde T und 15,16 % (w/w) Perligran (Kausek, Mittenwalde) sieben Tage nach Keimung. Pflanzen zur Protoplastierung (2.2.4.2.2.) wurden im SD in der Phytokammer bei 22 °C, ~150 µmol/m²s auf Jiffy7-Erde angezogen. Um gleichmäßiges Keimungsverhalten zu gewährleisten, wurden die Samen unabhängig von Anzuchtbedingungen nach dem Aussäen 2-3 Tage bei 4 °C stratifiziert. Charakterisierung des *cpk28*-Phänotyps erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten durch Messung des Rosettendurchmessers bzw. der Pflanzenhöhe von der Erdoberfläche bis zur Infloreszenzspitze der Pflanze.

2.2.7.1.2. *Arabidopsis thaliana*-Hormonbehandlung

Hormonapplikation zur Untersuchung des Hormoneinflusses auf die Sprosselongation erfolgte durch Sprühbehandlung mit entweder 0,95% EtOH (Kontrollbehandlung), 100 µM GA₃, 100 µM Epibrassinolid (BR) oder 100 µM Indol-3-Essigsäure (IAA) (jeweils gelöst in 0,95% EtOH) jeden zweiten bis dritten Tag ab Keimlingsstadium.

2.2.7.1.3. Anzucht unter verschiedenen Lichtqualitäten

In Kooperation mit Dr. Mark Aurel Schöttler am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie wurde Pflanzenanzucht in CLF floraLED-Wachstumsschränken unter den spezifischen Lichtqualitäten Blau ($\lambda = 440$ nm) bzw. Rot ($\lambda = 660$ nm) und mit LEDs als Weißlichtquelle bis zur Reproduktionsphase der Pflanzen durchgeführt. Im Weißlicht erfolgte die Anzucht unter Standard-Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Die maximal mögliche Lichtintensität der Lichtschränke für Anzucht in Blau- bzw. Rotlicht betrug $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und erfolgte unter kontinuierlicher Belichtung (Guo *et al.* 1998).

2.2.7.1.4. *Nicotiana benthamiana*-Anzucht

N. benthamiana-Pflanzen wurden auf Floratonerde (92 % Hochmoortorf; 0,15 % Salzgehalt, pH 5 bis pH 6) kultiviert. Die Samen wurden nach dem Aussäen für drei Tage bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ stratifiziert und im LD im Gewächshaus kultiviert (16 h Photoperiode, 22°C , Luftfeuchtigkeit ca. 30 %). Für die transiente Expression wurden etwa fünf Wochen alte Pflanzen verwendet.

2.2.7.2. Plattenexperimente mit *A. thaliana*

2.2.7.2.1. *A. thaliana*-Samen-Sterilisation

Bei Anzucht von *A. thaliana* auf 0,5x MS-Agar-Platten wurden oberflächensterilisierte Samen verwendet. Sterilisation erfolgte durch 2 min Inkubation in 70 % (v/v) Ethanol, gefolgt von 15 min Inkubation in Sterilisationslösung (6 % (v/v) Natrium-hypochlorid, 0,1 % Tween 20). Nach 5x Waschen mit sterilem ddH₂O erfolgte Trocknung auf sterilem Filterpapier oder direktes Ausbringen auf Wachstumsplatten.

2.2.7.2.2. Wachstumsexperimente auf Platten

Zur Selektion der in dieser Arbeit hergestellten Linien wurden Pflanzen auf 0,5x MS-Medium mit $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Phosphinotricin angezogen (0,8 % (w/v) Pflanzenagar).

Hormonbehandlung in Hypocotylelongationsexperimenten erfolgte auf 0,5x MS-Platten mit $10 \mu\text{M}$ GA₃ oder $1 \mu\text{M}$ PAC. Die Platten mit sterilen Samen wurden 2 Tage bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und anschließend 6 Tage zur Hypocotylelongation vertikal bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ im LD inkubiert. Auswertung der Hypocotyllängen erfolgte mit Image J (NIH, USA).

Hypocotylelongationsexperimente in unterschiedlichen Lichtqualitäten erfolgten unter Anleitung von Dr. Kenji Hashimoto in der AG Kudla, Universität Münster. Sterilisierte Samen wurden auf nasse, sterile Rundfilter in Petrischalen ausgebracht und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 Tage inkubiert. Dann wurde 3 h mit Weißlicht belichtet und 21 h bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln inkubiert. Belichtung mit Rotlicht ($\lambda = 660$ nm), Blaulicht ($\lambda = 470$ nm) und Dunkelrotlicht

($\lambda = 735 \text{ nm}$) erfolgte in Stapeln von je sieben Platten bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ für 3 Tage in LED-Wachstumsschränken der Firma RUMED Rubarth Apparate GmbH (Laatzen). Auswertung der Hypocotyllängen erfolgte nach Scannen der Platten mit Image J.

2.2.7.2.3. Keimungsanalysen

Sterilisierte Samen wurden auf 0,5x MS-Platten ausgebracht, 2 Tage bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ stratifiziert und anschließend im LD bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Keimungsraten wurden durch Quantifizierung des Austritts der Keimwurzel aus der Samenschale zu den Zeitpunkten 20 h bzw. 38 h bestimmt.

2.2.7.3. Stabile *A. thaliana*-Transformation und Selektion

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* wurde die *floral dip*-Methode (Clough und Bent 1998) angewendet. 200 ml YEB-Medium inklusive der entsprechenden Antibiotika wurden mit einer frischen 20 ml-*A. tumefaciens*-Übernachtskultur, das entsprechende Konstrukt enthaltend, angeimpft. Nach 20 h Inkubation bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 rpm wurde die Kultur 15 min bei $3\,000 \times g$ zentrifugiert und das Pellet in 200 ml 5 % (w/v)-Saccharose-Lösung mit 0,05 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) resuspendiert. Blühende Pflanzen wurden für einige Sekunden kopfüber in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend mit einer Plastiktüte abgedeckt. Nach Inkubation unter reduzierten Lichtbedingungen über Nacht erfolgte der Transfer ins Gewächshaus am nächsten Tag. Nach ca. 6 Wochen wurden die Samen geerntet. Als Selektionsmarker für in dieser Arbeit generierte transgene *Arabidopsis*-Linien wurde die Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) verwendet. Zur Selektion wurden Pflanzen der Folgegeneration mit Glufosinat (BASTA, Bayer, Leverkusen) besprüht und überlebende Individuen auf entsprechende Proteinexpression getestet.

2.2.7.4. Kreuzung von *Arabidopsis*-Linien

Durch Kreuzung zweier *Arabidopsis*-Linien wurden deren Merkmale miteinander vereinigt. Dafür wurden sämtliche Blütenorgane, außer dem Gynözeum der maternalen Pflanze vorsichtig entfernt und die Narbe mit dem Pollen einer anderen Linie befruchtet. Für beide Merkmale homozygote Pflanzen in der F₂-Generation wurden über PCR mit genomischer DNA identifiziert.

2.2.7.5. Histochemische Färbung der Glucuronidase-Aktivität

Für die Promotor-Expressionsanalyse mittels GUS-Färbung wurde das Pflanzenmaterial in geeigneten Reaktionsgefäßen mit GUS-Lösung (50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2), 0,2 % Triton X-100, 10 mM Ferrocyanid, 10 mM Ferricyanid, 1 mg/ml 5-Brom-4-

chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure (X-Gluc, Carl Roth, Karlsruhe)) überschichtet. Die offenen Reaktionsgefäße wurden im Exsikkator dreimal für jeweils 5 min unter Vakuum gesetzt und anschließend verschlossen über Nacht bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Entfärbung und Lagerung bis zur mikroskopischen Analyse erfolgte in 70 % Ethanol. Handschnitte gefärbter basaler Sprossinternodien wurden auf Expressionsmuster in der Sprossanatomie untersucht. Bilder wurden mit einem Nikon SMZ800 Stereomikroskop (Nikon Instruments Europe BV, Niederlande) oder einem Zeiss Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen) generiert.

2.2.7.6. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzanalyse nach transienter Proteinexpression in *N. benthamiana* oder stabil-transformierter *Arabidopsis thaliana*-Linien bzw. der BiFC-Experimente erfolgte mit einem inversen, konfokalen Fluoreszenzmikroskop cLSM 510 Konfokal-Laser-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Die Epidermis der Blattunterseite wurde auf einem Objektträger mit Deckgläschen und etwas Wasser mit einer Extinktionswellenlänge von 514 nm (Argonlaser) für YFP bzw. 561 nm (DPSS-Laser) für mCherry bei den Emissionswellenlängen von 530-550 nm (YFP), 600-620 nm (mCherry) bzw. 680-720 nm (Chloroplasten-Autofluoreszenz) auf Fluoreszenz überprüft. Zur Auswertung und Generierung von Bilddateien wurde die Software Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems, Mannheim) genutzt.

2.2.7.7. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur rasterelektronenmikroskopischen Analyse wurden die Infloreszenzmeristeme der Hauptinfloreszenz blühender WT- bzw. *cpk28*-Pflanzen unter dem Stereomikroskop durch Entfernen aller älteren Blüten freigelegt, sodass nur Blüten im Entwicklungsstadium 1-6 nach Smyth *et al.* (1990) zu erkennen waren. Nach Fixierung in FAA (1,25 % Formalin, 5 % Essigsäure, 43,6 % Ethanol) erfolgte Überführung in FDA (Formaldehyd-dimethylacetal, Fluka, St. Gallen, Schweiz) und nachfolgend Aceton. Kritisch-Punkt-Trocknung, Goldbespaltung und rasterelektronische Aufnahmen an einem LEO 430 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen) wurden wie bei Krupkova *et al.* (2007) durchgeführt. Die REM-Aufnahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit Christine Grüber am Institut für Botanik, FU Berlin.

2.2.7.8. Histologie und Färbung der Sprossanatomie

2.2.7.8.1. Paraffineinbettung, Mikrotomschnitte und Astrablau-Safraninrot-Färbung

Zur Lichtmikroskopie der Sprossanatomie wurden basale Fragmente der untersten Sprossinternodien in 4 % Paraformaldehyd (in 1x PBS-Puffer (137 mM NaCl, 10 mM

Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, pH 7,4) zweimal im Exsikkator infiltriert, über Nacht bei 4°C unter Schütteln fixiert, mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und tertiärem Butanol entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Leitz 1515 Mikrotom (früher Leitz, jetzt Leica, Wetzlar) wurden ca. 10 µm dicke Schnitte angefertigt, deparaffiniert und mit Safraninrot (0.1 v/v) und Astrablau (0.32 v/v) gefärbt. Fixierung der Färbung erfolgte mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg), Mikroskopie wurde mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen) durchgeführt. Die Durchführung der Einbettung, Mikrotomschnitte und Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hartmut Hilger am Institut für Botanik, FU Berlin.

2.2.7.8.2. Handschnitte und Phloroglucinolfärbung

Handschnitte der basalen Sprossquerschnitte wurden ohne vorherige Fixierung mit einer Rasierklinge angefertigt. Nach fünfminütiger Färbung in Phloroglucinol-Lösung (2 % Phloroglucinol in 95 % Ethanol) erfolgte Ansäuerung der Färbelösung mit drei Tropfen konzentrierter Salzsäure (37 %) und sofortiger Mikroskopie der Schnitte mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen).

2.2.8. Statistische Auswertung

Auswertung aller statistischen Analysen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, USA). Durchgeführt wurde ein unabhängiger *t*-test mit den Signifikanzwerten * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ und *** = $P < 0.001$.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der *in vivo*-Funktion der CPK28

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt in der Charakterisierung der calcium-abhängigen Proteinkinase CPK28 aus *Arabidopsis thaliana*. Die *in vivo*-Funktion der Kinase in der Sprosselongation und der Leitgewebeentwicklung, und die Rolle der CPK28 im Hormonhaushalt von *A. thaliana* werden im ersten Teil der Arbeit durch eine ausführliche Analyse von *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien beschrieben. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung der CPK28 mittels *in vitro*- und *in vivo*-Analysen verschiedener Proteinvarianten. Abschließend werden die Ergebnisse aus Interaktionsanalysen dargestellt, die zur Identifikation eines möglichen *in vivo*-Substrats der CPK28 durchgeführt wurden.

3.1.1. Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien von CPK28

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien wurden auf die Lokalisation der T-DNA-Insertion überprüft, um im Zusammenhang mit RT-Analysen die Einschätzung der Funktionalität von eventuellen Resttranskripten zu ermöglichen.

3.1.1.1. Bestimmung des T-DNA-Insertionsortes in Linien mit Insertionsereignis in CPK28

Durch laborinterne Vorarbeiten standen für CPK28 zu Anfang dieser Arbeit bereits zwei unabhängige, homozygote T-DNA-Insertionslinien zu Verfügung: *cpk28-1* (GK-523B08) und *cpk28-2* (GK-061C04) (Kleinboelting *et al.* 2012). Die Genstruktur der CPK28 umfasst 2754 Basenpaare (bp), bestehend aus zwölf Exons und elf Introns (Abb. 3-1A). Der codierende Bereich enthält 1572 bp und beinhaltet die Information für das CPK28-Protein mit einer Größe von 59 kDa. Die für die untersuchten T-DNA-Insertionslinien annotierten Insertionen in Exon 8 (*cpk28-1*) bzw. Exon 11 (*cpk28-2*) (www.gabi-kat.de) wurden durch PCRs mit geeigneten Oligonukleotiden gemäß der genomischen Sequenz der CPK28 bzw. der T-DNA (verbundene Pfeile in Abb. 3-1A) und anschließender Sequenzierung des PCR-Produkts überprüft und bestätigt.

Für *cpk28-1* konnten PCR-Produkte auf beiden Seiten der T-DNA-Insertion erhalten werden (Abb. 3-1B), es handelt sich also im vorliegenden Fall um die annotierte Insertion. Für *cpk28-2* war nur die Lokalisierung mittels der LB-Oligonukleotid-PCR erfolgreich, sämtliche Amplifikationsversuche mit unterschiedlichen Oligonukleotidkombinationen innerhalb der RB-Sequenz oder auch der LB-Sequenz (im Falle einer Tandeminsertion der T-DNA (Rosso *et al.* 2003)) mit verschiedenen genomischen CPK28-Oligonukleotiden führten nie zu einem PCR-Produkt (nicht gezeigt). Da jedoch, wie im Laufe dieser Arbeit beschrieben, *cpk28-1* und *cpk28-2* identische Phänotypen aufweisen und sich in

sämtlichen Analysen gleich verhalten, wird von einer wie im Schema dargestellten T-DNA-Insertion innerhalb der codierenden Sequenz des *CPK28*-Gens ausgegangen.

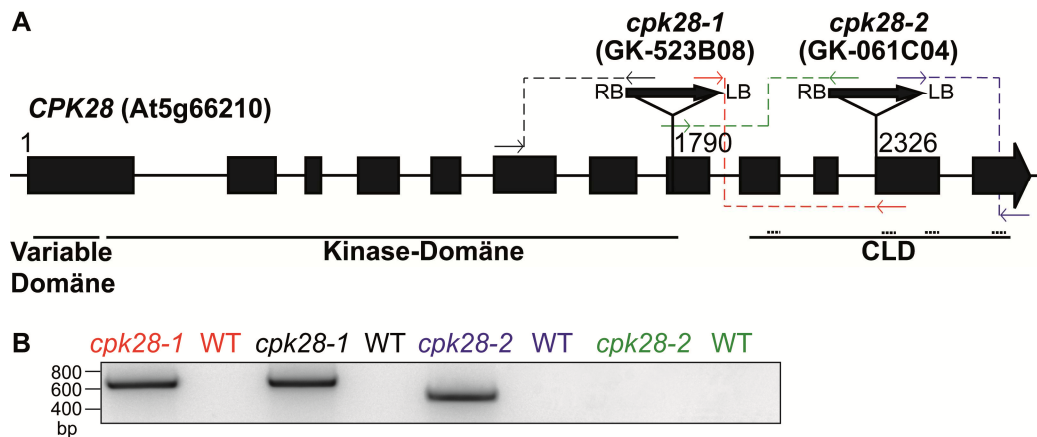


Abbildung 3-1: Genstruktur der *CPK28* und Lokalisation der T-DNA-Insertionen. **A** Schematische Darstellung der Genstruktur von *CPK28*, bestehend aus 12 Exons (Rechtecke und Pfeil) und 11 Introns (Linien). Zahlen zeigen die Nukleotidposition ab dem Startpunkt der Translation an. Eingezeichnete T-DNA-Insertionen sind nicht maßstabsgetreu. Farbige Pfeile markieren die in (B) verwendeten Oligonukleotide. Unterhalb des Schemas sind die jeweils korrespondierenden Regionen der konservierten modularen CDPK-Struktur abgebildet (EF-Hände als gepunktete Linien). **B** PCR-Produkte der Lokalisationsanalyse. Die PCR-Reaktionen erfolgten jeweils mit strangaufwärts 5'-bindenden Oligonukleotiden in Kombination mit einem im *Right Border*-(RB)-Bereich der T-DNA bindenden Oligonukleotid oder einem abwärts der T-DNA bindenden Oligonukleotid mit einem im *Left Border*-(LB)-Bereich der T-DNA bindenden Oligonukleotid. Die Farbcodierung aus A wurde beibehalten.

3.1.1.2. Nachweis eines Resttranskripts in *cpk28*-Mutanten

Da die Lokalisation der T-DNA-Insertionen, strangabwärts der Kinasedomäne, in beiden untersuchten *cpk28*-Linien die Möglichkeit eines funktionalen Resttranskripts ähnlich einer calcium-unabhängigen, konstitutiv-aktiven *CPK28*-Variante, nur aus variabler und Kinasedomäne (VK) bestehend, zulässt, wurde mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht, welche Bereiche der *CPK28*-mRNA in beiden Linien tatsächlich transkribiert werden (Abb. 3-2).

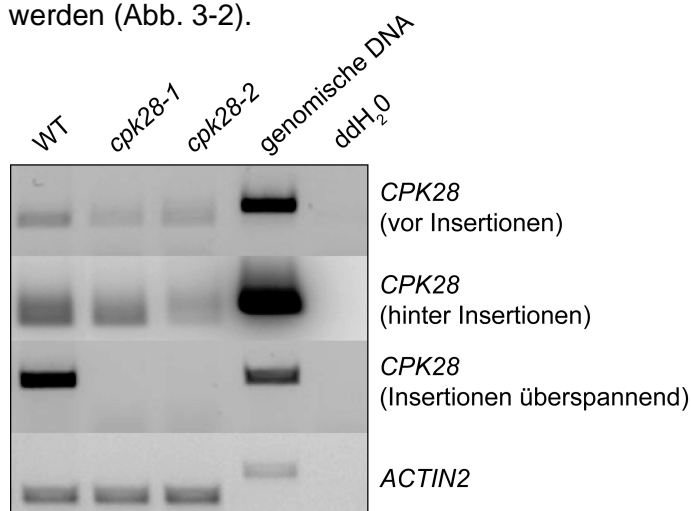


Abbildung 3-2: ***CPK28*-Resttranskriptanalyse in *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien.** Semiquantitative RT-PCR-Analysen mit *CPK28*-Oligonukleotiden, die entweder strangaufwärts beider Insertionen (*CPK28*, vor Insertionen), -abwärts (*CPK28*, hinter Insertionen) oder die Insertionsstellen flankierend (*CPK28*, Insertionen überspannend) binden. Als Referenzgen diente *ACTIN2*.

Sowohl vor als auch nach den T-DNA-Insertionen konnte in beiden untersuchten *cpk28*-Linien teilweise Resttranskript der *CPK28* festgestellt werden, was die Möglichkeit offenlässt, mit T-DNA-Insertionslinien zu arbeiten, die einen Funktionsgewinn durch die Expression einer konstitutiv-aktiven CPK28-Variante erhalten. Es bleibt zu erwähnen, dass diese Resttranskripte nicht in jeder untersuchten *cpk28*-cDNA-Probe auftraten (nicht gezeigt). Des Weiteren konnte jedoch kein die Insertion überspannendes Vollängen-transkript detektiert werden, die T-DNA-Insertionen verhindern also tatsächlich die Bildung eines CPK28-Vollängenproteins. Ob es sich bei den untersuchten Linien um tatsächliche Funktionsverlustmutanten mit Sinnlostranskripten der *CPK28* oder um Funktionsgewinn-Mutanten mit konstitutiv-aktivem, calcium-unabhängigem CPK28-Protein handelt, wird im Laufe dieser Arbeit erörtert und diskutiert.

3.1.1.3. Genetische Analysen der *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien

Im Folgenden werden klassische genetische Analysen beschrieben, mit denen die in dieser Arbeit verwendeten T-DNA-Insertionslinien charakterisiert wurden. Hierbei wird der später ausführlich analysierte Sprosselongationsphänotyp, der für *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien beobachtet wurde, als Analysewerkzeug herangezogen. Weitere Details zum Phänotyp folgen direkt nach der Darstellung der genetischen Analysen.

3.1.1.3.1. Untersuchung der Dominanz des *cpk28*-Phänotyps in heterozygoten WT/*cpk28-1*-Pflanzen

Die Frage nach einer Funktionsverlust- oder Funktionsgewinnmutation ist im Fall der hier bearbeiteten *cpk28*-Linien berechtigt, nachdem Resttranskript in beiden Linien detektiert werden konnte (Abb. 3-2). Bei Translation des verkürzten *CPK28*-Transkripts zu einem Protein ähnlich einer VK-Version würden die untersuchten Linien Funktionsgewinn- (*gain-of-function*)-Mutanten darstellen. Deshalb wurden Wildtyp und *cpk28-1*-Pflanzen reziprok gekreuzt und die entstandenen F1-Pflanzen hinsichtlich des Auftretens des *cpk28*-Phänotyps untersucht (Abb. 3-3).

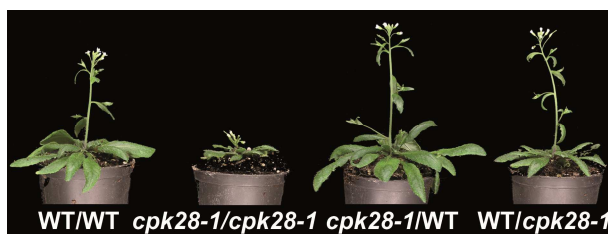


Abbildung 3-3: Morphologie heterozygoter *cpk28*-Pflanzen.

Phänotypisches Erscheinungsbild von Wildtyp (WT/WT), homozygoter *cpk28-1* (*cpk28-1/cpk28-1*) und heterozygoten *cpk28-1* (*cpk28-1/WT* bzw. *WT/cpk28-1*) Pflanzen (36 Tage LD). Diese wurden sowohl durch Pollination von *cpk28-1* mit Wildtyp-Pollen als auch *vice versa* erzeugt und in der F1-Generation untersucht. Maßstab = 5 cm.

In beiden Kreuzungen konnte in heterozygoten F1-Pflanzen keinerlei Abweichung im Vergleich zur Wildtyp-Morphologie detektiert werden.

3.1.1.3.2. Komplementationstest auf Allelie der Linien *cpk28-1* und *cpk28-2*

Zur Überprüfung der Allelie von *cpk28-1* und *cpk28-2* wurden beide Linien jeweils reziprok miteinander verpaart und die F1-Generation hinsichtlich der Ausbildung des *cpk28*-Phänotyps untersucht (Abb. 3-4).

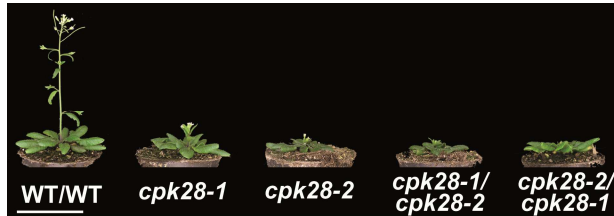


Abbildung 3-4: Test auf Allelie der *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien. Morphologie von Wildtyp (WT/WT), homozygoter *cpk28-1* (*cpk28-1/cpk28-1*) und *cpk28-2* (*cpk28-2/cpk28-2*), und heterozygoten *cpk28-1-cpk28-2*-Pflanzen (*cpk28-1/cpk28-2* bzw. *cpk28-2/cpk28-1*) (40 Tage LD). Diese wurden durch Pollination von *cpk28-1* mit *cpk28-2*-Pollen oder *vice versa* erzeugt und in der F1-Generation untersucht. Maßstab = 5 cm.

Die reziproken Kreuzungen zeigten in der F1-Generation den *cpk28*-Phänotyp, obwohl beide Allele jeweils in ihrer heterozygoten Form vorlagen. Dies spricht für die Ursächlichkeit der verschiedenen Mutationen im gleichen Gen für das Auftreten des Phänotyps.

3.1.2. Phänotypische Untersuchung der *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien

Im Zuge der Untersuchungen zur Funktion diverser Mitglieder der CPK-Familie aus *Arabidopsis thaliana* wurde ein robuster Phänotyp der *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien im Labor der AG Romeis entdeckt. Im Weiteren soll nun erstmalig eine möglichst genaue Beschreibung der diversen Aspekte dieses Entwicklungsphänotyps erfolgen.

3.1.2.1. Sprosselongation

Für beide T-DNA-Insertionslinien *cpk28-1* und *cpk28-2* wurde als auffälligstes Merkmal ein identischer Sprosselongationsphänotyp beobachtet. Dieser war von der Photoperiode unabhängig (Abb. 3-5A), sowohl unter Langtag-(LD)-bedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) als auch unter Kurztag-(SD)-bedingungen (8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit) zeigten die *cpk28*-Mutanten eine dramatische Verkürzung des Hauptsprosses, die im gravierendsten Fall zur Ausbildung von nur wenigen Blüten direkt am Rosettenansatz führte. Die Sprosslänge im Wildtyp betrug unter LD-Bedingungen an Tag 42 ca. 20 cm, während die *cpk28*-Linien nur ca. 1 bis 4 cm elongierten (Abb. 3-5B).

Der Phänotyp ging aufgrund der geringen Sprosshöhe automatisch mit geringerer Blütenzahl und infolgedessen geringerer Saatgutmenge pro Pflanze einher, wobei die Fertilität der *cpk28*-Mutante nicht beeinträchtigt war. Die Existenz von Schoten, wie in Abbildung 3-5A zu sehen, weist auf die uneingeschränkte Fähigkeit der *cpk28*-Linien zur Selbstfertilisation hin.

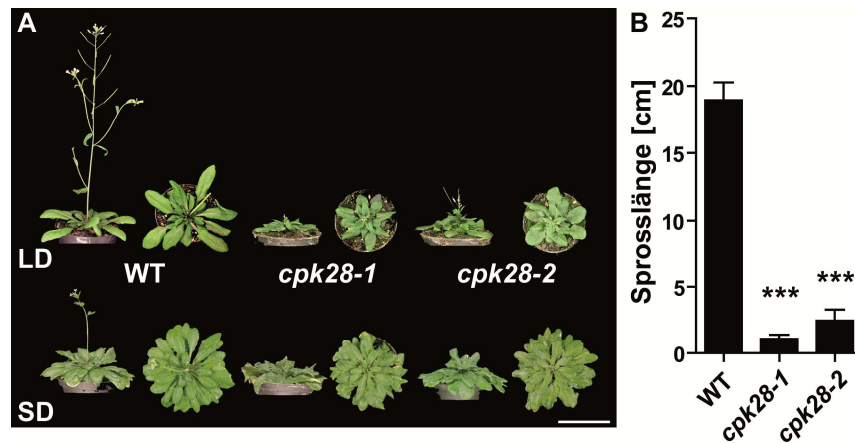


Abbildung 3-5: A Rosettenmorphologie und Sprosselongation von Wildtyp und *cpk28*-Mutanten. Langtagbedingungen (LD = 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit, 40 Tage alt) und Kurztagbedingungen (SD = 8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkelheit, 75 Tage alt). Maßstab = 5 cm. **B** Sprosslänge von Wildtyp und *cpk28*-Mutanten (42 Tage LD) (n = 15). Werte stellen den Mittelwert \pm Standardfehler aus n biologischen Replikaten dar, exemplarisch für ähnliche Ergebnisse in drei unabhängigen Experimenten. Daten wurden mittels zweiseitigem t-test für unabhängige Stichproben statistisch überprüft (signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$).

Interessanterweise konnte der Wachstumsphänotyp der *cpk28*-Mutanten erst nach dem Übergang der Pflanzen in die generative Phase beobachtet werden. Abbildung 3-6 zeigt die zeitabhängige Entwicklung der Rosettenmorphologie von Wildtyp und *cpk28*.

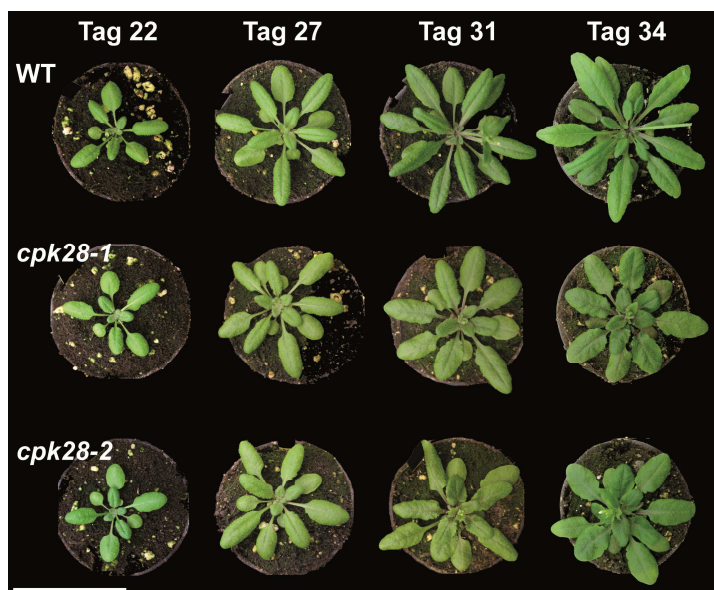


Abbildung 3-6: Zeitabhängige Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps. Entwicklung der Rosettenmorphologie von Wildtyp und *cpk28*-Insertionslinien unter Langtagbedingungen. Aufnahme der Bilder erfolgte von oben zu den angegebenen Zeitpunkten. Maßstab = 5 cm.

Im vegetativen Zustand bis ca. Tag 27 war mit bloßem Auge kein Unterschied zwischen Wildtyp und *cpk28* zu erkennen. Erst nach dem Übergang zur reproduktiven Phase, der im Wildtyp durch die Initiation der ersten Blüte und die Elongation der ersten Internodie charakterisiert ist (Pouteau und Albertini 2009), veränderte sich die Entwicklung der *cpk28* im Vergleich zum Wildtyp. Die Internodienelongation in Wildtyppflanzen begann normalerweise um Tag 30. *cpk28*-Mutanten wiesen dann extrem reduziertes Wachstum der Internodien auf, was zum oben beschriebenen verkürzten Spross führte.

3.1.2.2. Blattmorphologie

Weitere Merkmale des entwicklungspezifischen *cpk28*-Phänotyps, die mit der Ausbildung des Sprosselongationsphänotyps einhergingen, waren eine veränderte Blattmorphologie und verkürzte Petiolen der Rosettenblätter in *cpk28* nach dem Übergang zur generativen Phase (Abb. 3-7).

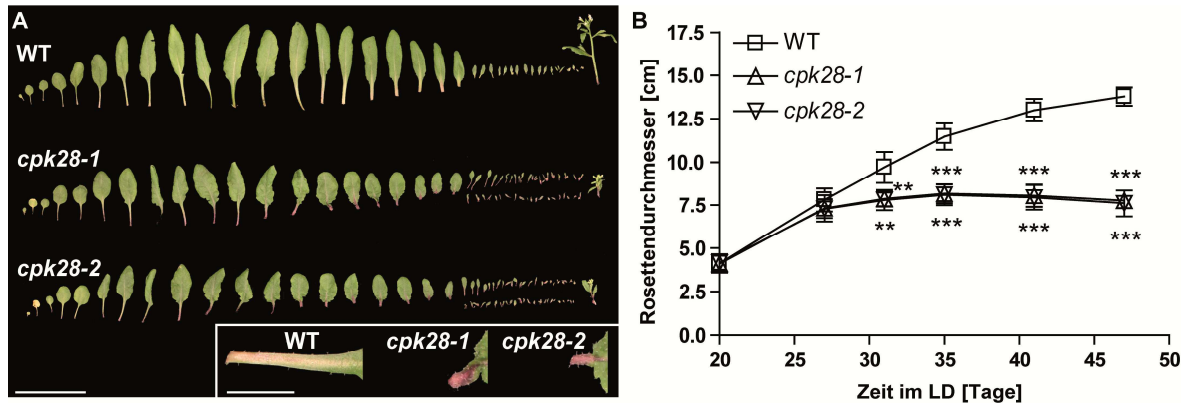


Abbildung 3-7: A Blattmorphologie von Wildtyp und *cpk28*-Mutanten (37 Tage LD). Maßstab = 5 cm. Die Vergrößerung zeigt entsprechende Petiolen des Rosettenblattes #14, Maßstab = 1 cm. **B** Zeitliche Entwicklung des Rosettendurchmessers in WT und *cpk28*-Mutanten (n = 15). Werte stellen den Mittelwert \pm Standardfehler aus n biologischen Replikaten dar, exemplarisch für ähnliche Ergebnisse in drei unabhängigen Experimenten. Daten wurden mittels zweiseitigem t-test für unabhängige Stichproben statistisch überprüft (signifikante Unterschiede ** = P < 0,01 und *** = P < 0,001).

Beide T-DNA-Insertionslinien der CPK28 wiesen im Laufe der Entwicklung immer schwerwiegendere Deformationen der Rosettenblätter auf (Abb. 3-7A). Die weißumrandete Einfügung in Abbildung 7A zeigt in Nahaufnahme der Petiolen des Rosettenblattes #14 an Tag 37 die extreme Verkürzung in beiden *cpk28*-Linien. Außerdem wurde für die Mutantenlinien nach der Blühinduktion Reduktion des Rosettendurchmessers beobachtet, ebenso ein indirektes Maß für verkürzte Petiolen und deformierte Blätter (Abb. 3-7B). Während der Wildtyp im Laufe seiner Entwicklung einen Rosettendurchmesser von ca. 13 cm erreichte, führte der Verlust der CPK28-Funktion zu einem maximalen Rosettendurchmesser von ca. 8 cm. Auch dieser Teil des *cpk28*-Phänotyps trat erst nach dem Übergang zur vegetativen Phase zu Tage, ab Tag 30 war ein signifikanter Unterschied im Rosettendurchmesser zu erkennen. Interessanterweise ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Rosettenblätter feststellen (Abb. 3-7A), was auf einen gleichen Blühzeitpunkt in Wildtyp und Mutante rückschließen lässt.

3.1.2.3. Anthocyangehalt

Wie schon anhand der Rotfärbung der *cpk28*-Petiolen in Abbildung 3-7A zu vermuten ist, konnte für die *cpk28*-Mutante ein höherer Anthocyangehalt im reproduktiven Stadium nachgewiesen werden (Abb. 3-8).

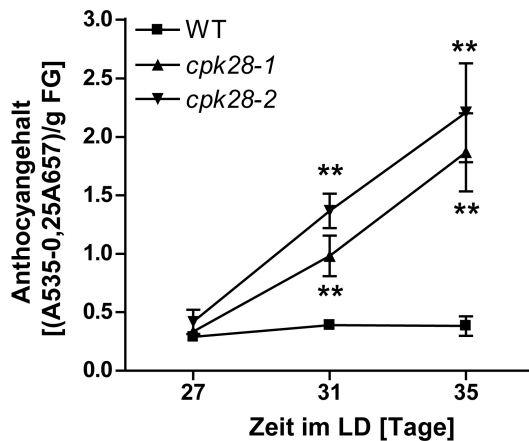


Abbildung 3-8: Anthocyanengehalt von WT und *cpk28*-Mutanten. Ganze Pflanzen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet, Anthocyane wurden ÜN in 80 % Methanol mit 5 % HCl extrahiert und photometrisch bestimmt. FG = Frischgewicht. Werte stellen den Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten dar, ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt. (*t*-test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede ** = $P < 0,01$).

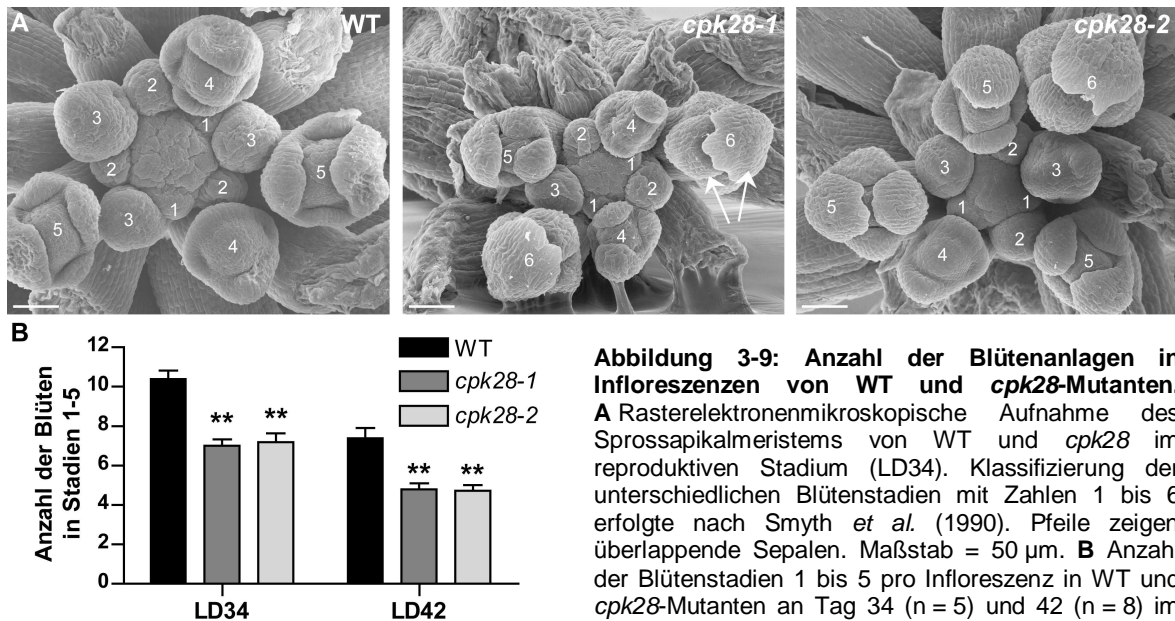
Saure Extraktion der Anthocyane in unterschiedlichen Entwicklungsphasen bestätigte den optischen Eindruck, an Tag 35 konnte eine acht- bis zehnfach erhöhte Menge an Anthocyanen in den *cpk28*-Mutantenlinien festgestellt werden. Auch diese Komponente des *cpk28*-Phänotyps wies den schon beschriebenen entwicklungsabhängigen Charakter auf, an Tag 27 konnte noch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten detektiert werden.

3.1.2.4. Sprossapikalmeristem

Nachdem in der Ausbildung des *cpk28*-Phänotyps neben der beschriebenen Sprosslängenreduktion auch eine Reduktion der Blütenanzahl und damit des Saatgutertrags einherging, wurde anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Aufbau und die Proliferation des Sprossapikalmeristems (SAM) untersucht, um eventuelle Unterschiede im Meristem oder der Blütenbildung zu dokumentieren. Hierzu wurden zu den Zeitpunkten LD34 und LD42 die Infloreszenzmeristeme der Hauptinfloreszenz blühender WT- bzw. *cpk28*-Pflanzen unter dem Stereomikroskop durch Entfernen aller älteren Blüten freigelegt, sodass nur noch Blüten im Entwicklungsstadium 1-6 nach Smyth *et al.* (1990) zu erkennen waren. Es werden zwölf unterschiedliche Blütenstadien je nach Entwicklungsstand der Primordien der verschiedenen Blütenorgane von 1 (jung) bis 12 (alt) definiert. Die Anzahl der einzelnen Stadien stellt ein Maß für die Proliferationsfähigkeit des Meristems dar. Die präparierten Meristeme wurden anschließend fixiert und mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert.

Abbildung 3-9A zeigt repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp und *cpk28* mit der Klassifizierung der Blütenstadien. Nachdem ab Stadium 6 keine weitere Unterscheidung ohne Entfernung der überlappenden Sepalen (Pfeile) in den einzelnen Blüten mehr möglich ist, wurden bei der Quantifizierung der Blütenanzahl pro Meristem (Abb. 3-9B) nur die eindeutig zu identifizierenden Stadien 1 bis 5 einbezogen. Hier ergab sich eine signifikante Reduktion der Blütenanzahl in *cpk28* im Vergleich zum Wildtyp. Während dieser an Tag 34 ca. zehn Blüten und an Tag 42 ca. sieben Blüten in

den Stadien 1 bis 5 aufwiesen, konnte für *cpk28* an Tag 34 nur ca. sieben Blüten und an Tag 42 im Durchschnitt fünf Blüten in den entsprechenden Stadien gezählt werden.



3.1.2.5. Sprossanatomie

Die starke Veränderung des Sprosses in den *cpk28*-Mutanten veranlasste eine genauere Untersuchung der Sprossanatomie, insbesondere des vaskulären Aufbaus der basalen Internodie. Hierzu wurde jeweils das unterste Segment des Sprosses in Wildtyp und *cpk28*-Linien geerntet, in Paraformaldehyd fixiert und in einer Ethanolreihe konserviert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 10 µm-dünne Quer- und Längsschnitte der basalen Internodien mit einem Mikrotom angefertigt und mit einer anschließenden Differentialfärbung wurde die Cellulose der unverholzten Zellwände mit Astrablau und Lignin in sekundären Zellwänden, ein Kennzeichen des sekundären Dickenwachstums (Ehltling *et al.* 2005), mittels Safraninrot nachgewiesen. Die lichtmikroskopische Analyse der gefärbten Sprosschnitte offenbarte eine deregulierte Zellentwicklung in den basalen Internodien der *cpk28*-Mutante, mit weniger lignifizierten Xylemgefäßelementen und im Gegenzug fortgeschrittenem sekundärem Dickenwachstum (Abb. 3-10).

Wildtypsprosse (Abb. 3-10A,D,G,J) zeigten den typischen Aufbau eines Leitbündels (Oval) mit lignifizierten Xylemgefäßen (rotgefärbt) umgeben von kleinzelligem Xylemparenchym (blau gefärbt). Die kompakte, kleinzellige Phloemschicht wurde zur Sprossperipherie hin von Phloemfasern (PF) begrenzt. Die interfazikuläre Region des Wildtypsprosses zeigt kambiale Zellteilungsaktivität (IF, Klammern) und eine Zellschicht von 4-5 Zellen war lignifiziert. Die *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien wiesen dazu klare Unterschiede in ihrem anatomischen Aufbau auf, wobei zwei hauptsächliche

Abweichungen hervorgehoben werden sollen (Abb. 3-10B/C, E/F, H/I, und K/L). Gemeinsame Merkmale der untersuchten *cpk28*-Schnitte waren einerseits die starke ektopische Lignifizierung der Phloemfasern (Pfeile in Abb. 3-10H,I) auf der anderen Seite jedoch eine starke Reduktion der großlumigen, lignifizierten Xylemelemente im Vergleich zum Wildtyp. Ein Teil der *cpk28*-Mutanten wies Unterschiede in der interfazikulären Region auf, wo die kambiaale Zellteilungsaktivität und die Anzahl von lignifizierten Zellen deutlich erhöht waren (Abb. 3-10F,I). Dieser Unterschied konnte jedoch nicht bei der Mehrheit der untersuchten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3-10E,H). Die erhöhte Lignifizierung in den *cpk28*-Sprossen wurde auch durch Längsschnitte bestätigt (Abb. 3-10K,L), die eine höhere Intensität der Safraninfärbung aufwiesen.

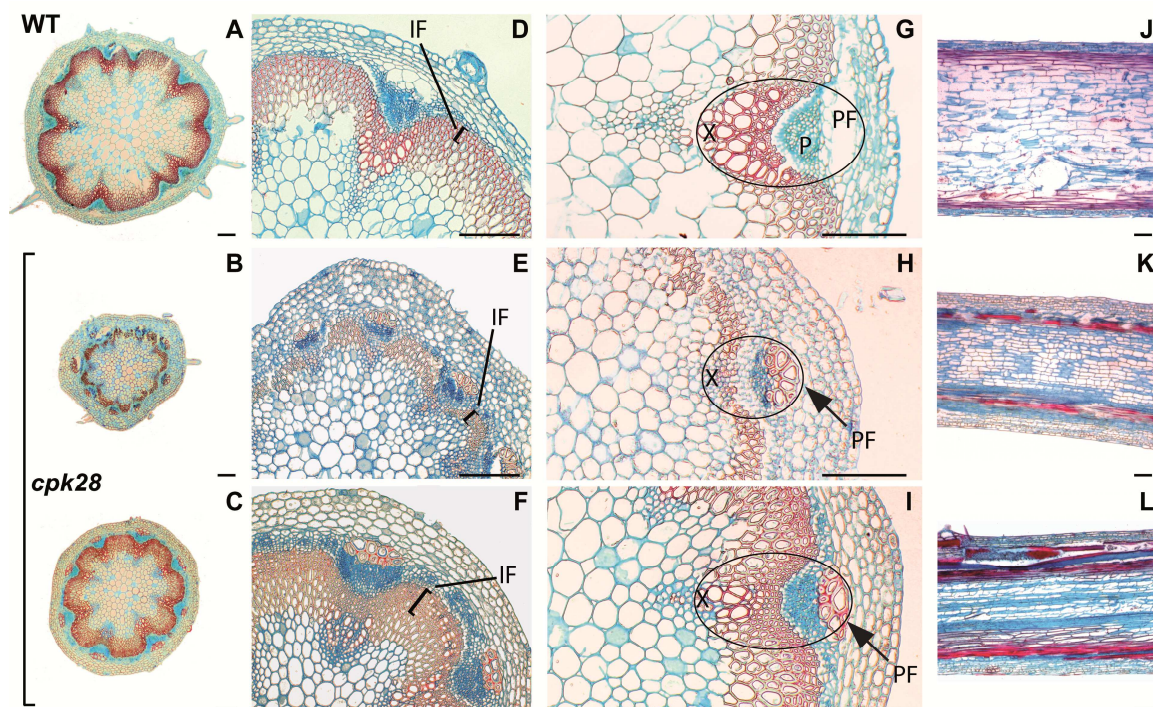


Abbildung 3-10: Sprossanatomie von Wildtyp und *cpk28*-Mutanten (46 Tage LD). Färbungen der Schnitte mit Astrablau (Cellulose) und Safraninrot (Lignin). **A-I** Querschnitte durch das basale Internodium in Wildtyp (A,D,G) und zwei unterschiedliche Ausprägungen des *cpk28*-Phänotyps (B,E,H bzw. C,F,I) in unterschiedlichen Vergrößerungen. P= Phloem, PF = Phloemfasern, X = Xylem, IF = Interfazikuläre Region. Pfeile zeigen lignifizierte Phloemfasern in *cpk28*, Ovale deuten Leitbündel mit weniger lignifizierten Xylemgefäßen in *cpk28* an, und Klammern stellen die interfazikuläre kambiaale Region dar. Der *cpk28*-Phänotyp in (C,F,I) wurde in 4 von 14 Querschnitten beobachtet. Maßstab = 100 µm (A-I). **J-L** Längsschnitte durch das basale Internodium von Wildtyp (J) und *cpk28* (K und L). Maßstab = 100 µm.

Abbildung 3-10A-C zeigt einen reduzierten Sprossdurchmesser in *cpk28* im Vergleich zum Wildtyp. Eine Analyse der Zellzahl entlang des Durchmessers des Sprossquerschnittes ergab keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl im Sprossquerschnitt (nicht gezeigt), weshalb die Reduktion des Durchmessers in der *cpk28*-Mutante durch kleinere Zellen und nicht durch eine verringerte Zellzahl bedingt sein muss.

3.1.2.6. Ligningehalt

Um den optischen Eindruck der verstärkten Lignifizierung der *cpk28*-Mutante zu bestätigen wurde eine Quantifizierung des Ligningehalts in Wildtyp und Mutanten durchgeführt.

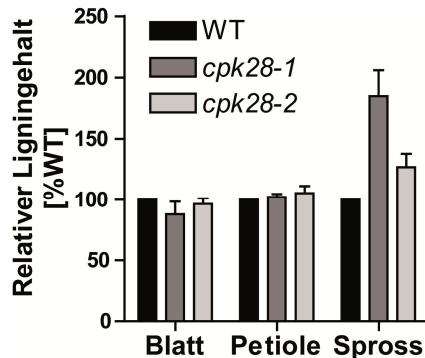


Abbildung 3-11: Quantifizierung des Ligningehalts in unterschiedlichen Geweben von Wildtyp und *cpk28* (46 Tage LD). Der Ligningehalt ist in Relation zum Wildtyplevel dargestellt. Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten, bestehend aus entsprechendem Gewebe von jeweils drei bis sieben Pflanzen.

Nach Zellwandgewinnung und Extraktion des ligninhaltigen Anteils mittels der Thioglykolsäure-Methode (Brinkmann *et al.* 2002) wurde der Ligningehalt verschiedener Pflanzengewebe (46 Tage LD) bestimmt (Abb. 3-11). Während weder Blätter noch Petiolen der Mutantenlinien einen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, konnte in den basalen Sprossabschnitten der *cpk28* ein 120-170 % höherer Ligningehalt im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden.

3.1.3. Expressionsanalysen von Markergenen des sekundären Dickenwachstums

Der nächste Schritt der Charakterisierung der *cpk28*-Mutanten umfasste eine Genexpressionsanalyse zur Identifizierung veränderter Genregulation im Bereich der Schlüsselenzyme des sekundären Dickenwachstums (Wang und Dixon 2012). Eine umfassende Analyse der Genexpression in *cpk28-1*, basierend auf einer qRT-PCR-Plattform mit 1885 *Arabidopsis thaliana*-Transkriptionsfaktoren (Czechowski *et al.* 2004, Balazadeh *et al.* 2008), die in Zusammenarbeit mit Dr. Salma Balazadeh in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Müller-Röber am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm durchgeführt wurde, ergab leider kaum konsistente Daten. Deshalb wird auf die Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit verzichtet. Eines der wenigen konstant deregulierten Gene in diesem Experiment, der NAC Transkriptionsfaktor *NST1* (*NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1*), zeigte erhöhte Genexpression in der *cpk28*-Mutante. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die vollständigen Rosetten von Wildtyp und *cpk28-1* in verschiedenen Entwicklungsstadien (10, 20, 27, 31 und 35 Tage LD) geerntet und Unterschiede in der *NST*-Genexpression mittels qRT-PCR untersucht.

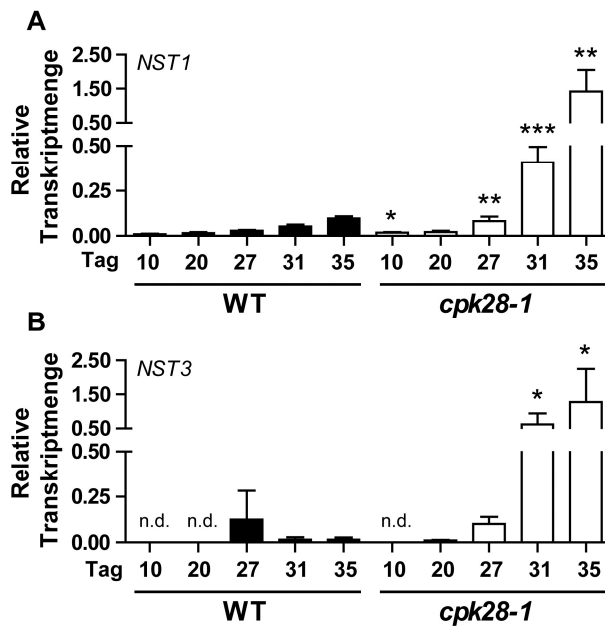


Abbildung 3-12: Induktion der NST-Genexpression in *cpk28*. Zeitabhängige Entwicklung der Genexpression von *NST1* (A) und *NST3* (B) in Wildtyp und *cpk28-1*, analysiert per qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). Daten wurden mittels zweiseitigem *t*-test für unabhängige Stichproben statistisch überprüft (signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$). Wiederholung des Experiments zeigte ähnliche Resultate. n.d. = nicht detektiert.

Sowohl für *NST1* als auch sein Homolog *NST3*, beide mit Funktionen im sekundären Dickenwachstums des Sprosses (Zhong *et al.* 2008), wurden erhöhte Transkriptmengen in der *cpk28-1*-Mutante im Gegensatz zu Wildtyppflanzen festgestellt (Abb. 3-12). Während *NST1*-Transkript in allen fünf analysierten Entwicklungsstadien detektiert werden konnte, erfolgte Genexpression von *NST3* nicht zu jedem Zeitpunkt. Dabei wurden von Tag 10 an bis Tag 35 erhöhte *NST1*-Transkriptmengen in *cpk28-1* beobachtet (Abb. 3-12A), diese Deregulation der Genexpression existierte also auch schon in sehr jungen Pflanzen, die noch keinen offensichtlichen Phänotyp aufwiesen. Im Falle der *NST3*-Expression konnten im Wildtyp Transkripte ab dem Tag 27 beobachtet werden, in *cpk28-1* erfolgte die Transkription früher (ab Tag 20) und in höherem Maße (Abb. 3-12B).

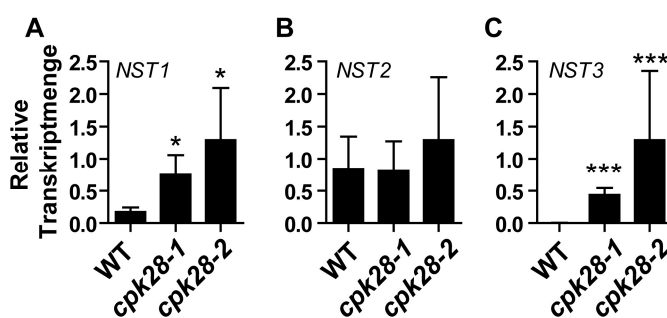


Abbildung 3-13: Genexpression von *NST1* (A), *NST2* (B) und *NST3* (C) in Wildtyp und *cpk28*-Insertionslinien. 31 Tage LD, analysiert per qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (Statistische Analyse mittels *t*-test; signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$). Wiederholung des Experiments zeigte ähnliche Resultate.

Erhöhte *NST1*- und *NST3*-Genexpression in *cpk28* wurde ebenso für die zweite T-DNA-Insertionslinie *cpk28-2* an Tag 31 (Abb. 3-13A,C) bestätigt. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Transkription eines weiteren *NST*-Transkriptionsfaktors, *NST2* (Abb. 3-13B), für den allerdings auch keine Funktion im sekundären Dickenwachstum des Sprosses, sondern des Endotheciums, einer speziellen Zellschicht der Staubbeutelwand, beschrieben wird (Zhong *et al.* 2008).

3.1.4. Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisation von CPK28

Um eine Einschätzung des CPK28-Expressionsprofils während des Pflanzenwachstums zu erhalten, wurde eine gewebespezifische Expressionsanalyse und subzelluläre Lokalisierung der CPK28 durchgeführt.

3.1.4.1. CPK28-Expressionsprofil in *pCPK28::GUS*

Zur Analyse der gewebe- und zelltypspezifischen Lokalisierung der CPK28 wurden transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen untersucht, die das β -Glucuronidase(*GUS*)-Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle eines 1,8 kb großen *CPK28*-Promotorfragments exprimierten. Die Expression wurde in drei unabhängigen Linien analysiert, die zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits als homozygote Linien zur Verfügung standen. *GUS*-Aktivität in diesen Pflanzen konnte während einer Vielzahl von Entwicklungsstadien in unterschiedlichen Geweben detektiert werden, wobei die Expression hauptsächlich mit der Vaskulatur und meristematischem Gewebe assoziiert werden konnte (Abb. 3-14).

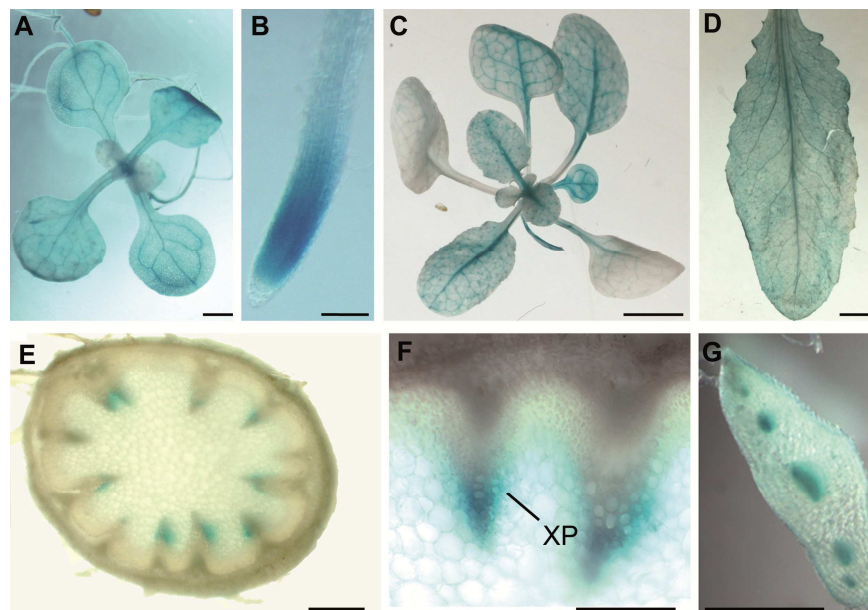


Abbildung 3-14: Promotoraktivität des *CPK28*-Gens. GUS-Färbung von *pCPK28::GUS*-exprimierenden Pflanzen (repräsentativ für drei unabhängige Linien). Rosette (A) und Wurzel (B) eines Keimlings (11 Tage LD), vegetative Rosette (22 Tage LD) (C), voll ausgebildetes Rosettenblatt (42 Tage LD) (D), Querschnitt durch das basale Internodium eines Sprosses (42 Tage) (E,F) und Querschnitt durch die Petiole eines voll ausgebildeten Rosettenblattes (G). XP = Xylemparenchym. Maßstab = 1 mm (A,G), 0,1 mm (B,E,F) und 0,5 mm (C,D).

CPK28-Promotor-abhängige *GUS*-Aktivität wurde in der Vaskulatur von Keimlingen (Abb. 3-14A), Pflanzen im vegetativen Stadium (Tag 22, Abb. 3-14C) und in den Leitgeweben ausgewachsener Rosettenblättern (Abb. 3-14D) beobachtet. Weiterhin war *CPK28*-Promotoraktivität in der Wurzelspitze von Keimlingen zu sehen, allerdings nicht in der Wurzelhaube (Abb. 3-14B). Zusätzlich schien die Promotoraktivität in den

untersuchten Stadien stets auch in der meristematischen Zone, hier in Keimlingen und der Rosette älterer Pflanzen gezeigt, assoziiert zu sein (Abb. 3-14A,C). Querschnitte des Sprosses in 42 Tage alten Pflanzen wiesen GUS-Färbung ausschließlich im Xylem auf, hauptsächlich auf Xylemparenchymzellen (XP) beschränkt (Abb. 3-14E,F). Auch in Querschnitten der Petiole eines voll ausgebildeten Rosettenblattes wurde GUS-Aktivität in der Vaskulatur detektiert (Abb. 3-14G). Hiermit wurden im Labor existierende Vordaten von Dr. Julia Legen bestätigt.

3.1.4.2. Subzelluläre Lokalisation von CPK28

Für CPK28 ist die subzelluläre Lokalisation an der Plasmamembran beschrieben (Dammann *et al.* 2003). Um die Lokalisation und damit den putativen Wirkungsort innerhalb der Zelle zu überprüfen und deren Bedeutung für die *in vivo*-Funktion zu untersuchen, wurde die codierende Sequenz unterschiedlicher *CPK28*-Varianten C-terminal mit dem Gen für das Gelb-Fluoreszierende-Protein (*YFP*) fusioniert. Hierzu wurde neben der Volllängenvariante (*CPK28-YFP*) und der verkürzten Version (*CPK28-VK-YFP*) mittels zielgerichteter Mutagenese auch die Variante *CPK28-G2A-YFP* generiert, die eine Mutation im Myristoylierungsmotiv trägt und somit eine Störung der Membranassoziation aufweist. Für diese Mutation wurde bereits Verschiebung der Proteinlokalisierung von der Plasmamembran in den Kern beobachtet (Mehlmer 2008). Die *YFP*-Fusionsproteine wurden unter der Kontrolle des konstitutiv-aktiven Blumenkohl-Mosaikvirus-(35S)-Promotors transient in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert. Als Lokalisationsmarker wurde das cytosolisch- und kernlokalisierte Protein mCherry koexprimiert und die Lokalisation der Proteine am konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 3-15).

Das *CPK28*-Wildtypprotein zeigte in Kollokalisierung mit mCherry eine eindeutig membranassoziierte Lokalisation (Abb. 3-15A). Während *CPK28-YFP* ausschließlich an der Plasmamembran (PM) detektiert wird, ist mCherry sowohl im Nucleus (N) als auch im Cytoplasma (C) zu erkennen. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder zeigt die unterschiedliche Lokalisation der Proteine, vor allem das Nichtvorhandensein der *CPK28* im Kern und das Fehlen von cytosolischen Fäden, wie sie beispielsweise in der cytoplasmatischen Lokalisation von freiem mCherry-Protein beobachtet werden, spricht für eine ausschließliche Membranassoziation. Die *CPK28-G2A*-Proteinversion zeigte in der Tat eine veränderte Lokalisation im Vergleich zum Wildtypprotein (Abb. 3-15B). Hier konnte das *YFP*-Fusionsprotein im Kern und im Cytosol beobachtet werden und wies eine deutliche Überlappung mit mCherry auf. *CPK28-VK-YFP* zeigte insgesamt eine schwächere Expressionsstärke, wies aber wie das Wildtyp-Protein eindeutige Membranassoziation auf (Abb. 3-15C).

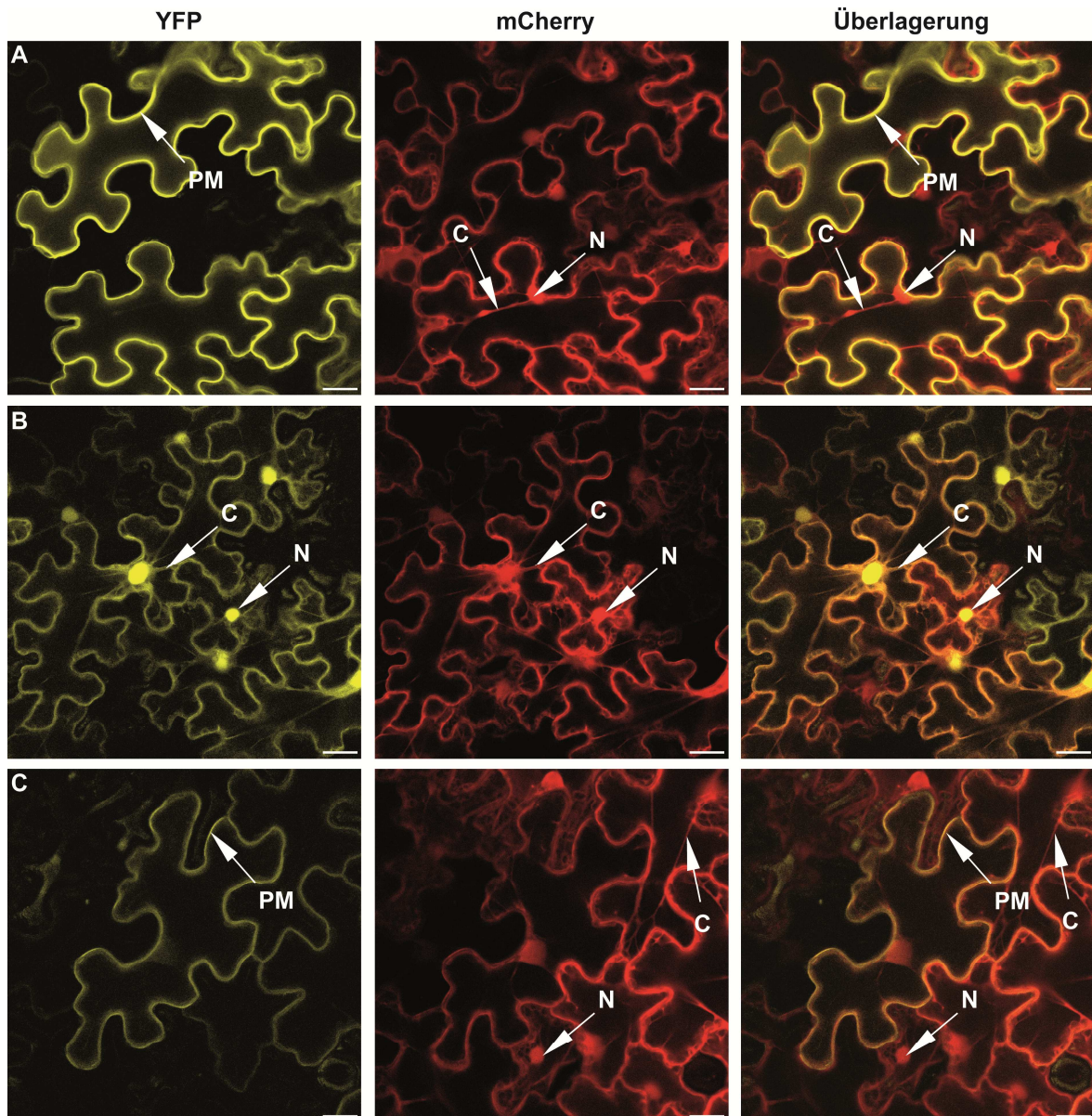


Abbildung 3-15: Subzelluläre Lokalisation von CPK28. Transiente Expression von CPK28-YFP (A), CPK28-G2A-YFP (B) und CPK28-VK-YFP (C) in *N. benthamiana*. Als Lokalisationsmarker für cytoplasmatische Proteine wurde eine Koexpression mit mCherry durchgeführt. PM = Plasmamembran, N = Nucleus, C = Cytoplasma. Maßstab = 25 µm.

In stabil-transformierten *Arabidopsis*-Komplementationslinien $pCPK28::CPK28-YFP$ mit CPK28-YFP-Expression unter dem nativen Promotor konnte am konfokalen Mikroskop keine Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Stabile Überexpression in den Komplementationslinien unter Kontrolle des 35S-Promotors ($35S::CPK28-YFP$) zeigte eine deutliche membranassoziierte Fluoreszenz, die im Abschnitt 3.4.4.1. gezeigt wird.

3.1.5. Komplementationsanalysen durch Expression verschiedener CPK28-Enzymvarianten in *cpk28-1*

Um eindeutig zu klären, ob der hier beschriebene Phänotyp der *cpk28*-Insertionslinien auf die fehlende Funktion der CPK28 zurückzuführen ist, wurde die Fähigkeit

unterschiedlicher Proteinvarianten der CPK28 getestet, den *cpk28*-Phänotyp *in vivo* zu komplementieren und durch Proteinexpression verschiedener Proteinversionen eine Wiederherstellung des Wildtypwachstums zu erreichen. Hierzu wurden stabile transgene *Arabidopsis*-Linien generiert, die im Hintergrund der *cpk28-1*-Insertionslinie verschiedene CPK28-Varianten unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren exprimieren.

3.1.5.1. Phänotypische Komplementation durch Überexpression bzw. Expression der CPK28 unter dem nativen Promotor

Als klassisches Komplementationsexperiment wurde zunächst die Komplementation durch Überexpression des Wildtypproteins ($35S::CPK28-YFP$) bzw. einer inaktiven Kinasevariante ($35S::CPK28-D188A-YFP$) und native Expression ($pCPK28::CPK28-YFP$) des Wildtypproteins untersucht. Mindestens zwei unabhängige Linien pro Konstrukt wurden auf Proteinexpression getestet und eine umfassende Analyse der Charakteristika des *cpk28*-Phänotyps durchgeführt (Abb. 3-16-18).



Abbildung 3-16: *In vivo*-Komplementation durch Expression von CPK28. **A** CPK28-YFP-Fusionskonstrukte unter konstitutivem (CaMV35S) ($35S::CPK28-YFP$, $35S::CPK28-D188A-YFP$) oder nativem ($pCPK28::CPK28-YFP$) Promotor wurden in die *cpk28-1*-Mutante eingebracht. Repräsentative Komplementation ist für zwei unabhängige Linien pro Konstrukt gezeigt. Maßstab = 5 cm. **B** Genexpressionslevel der CPK28 in Wildtyp, $35S::CPK28-YFP$ und $pCPK28::CPK28-YFP$ (31 Tage LD). Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat).

Die Expression des aktiven CPK28-YFP-Fusionsproteins sowohl unter dem nativen als auch dem 35S-Promotor führte zu einer vollständigen Restauration des Wildtypwachstums in *cpk28-1*, während die Expression der inaktiven Kinasevariante den *cpk28*-Phänotyp nicht aufheben konnte (Abb. 3-16A). Die Morphologie der Komplementationslinien mit aktivem Protein war mit dem Wildtyp vergleichbar, wobei die CPK28-Expressionstärke je nach Promotor sehr unterschiedlich war (Abb. 3-16B). Die CPK28-Genexpression, per qRT-PCR analysiert, erreichte vergleichbare Level in Wildtyp und nativer Komplementationslinie, während die Überexpressionslinie eine ca. 20-fache Erhöhung der Transkriptmenge aufwies. Die Untersuchung weiterer Merkmale der *cpk28*-

Mutante bestätigte die Reversion des Phänotyps in den analysierten Komplementationslinien mit aktivem CPK28-Protein (Abb. 3-17).

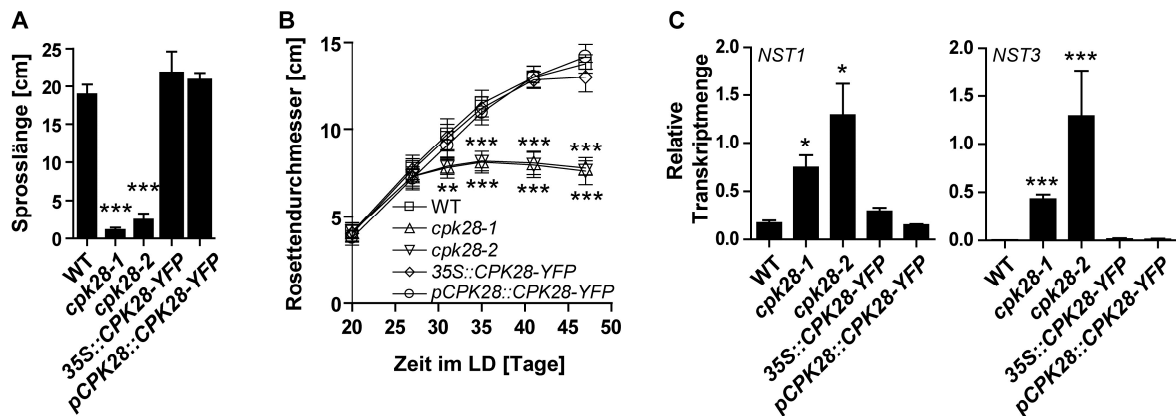


Abbildung 3-17: Reversion der phänotypischen Ausprägungen von *cpk28* in Überexpressions- und Komplementationslinien. Sprosslänge (A, 42 Tage LD) und zeitliche Entwicklung des Rosettendurchmessers (B) in Wildtyp, *cpk28*, 35S::CPK28-YFP und pCPK28::CPK28-YFP im *cpk28-1*-Hintergrund (n = 15). C Genexpression von *NST1* und *NST3* in WT, *cpk28*, 35S::CPK28-YFP und pCPK28::CPK28-YFP (31 Tage LD), analysiert mit qRT-PCR (n = 3). Werte repräsentieren den Durchschnitt aus n biologischen Replikaten \pm Standardfehler. Statistische Analyse mittels *t*-test; signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$). Wiederholung der Experimente zeigte ähnliche Resultate.

Sowohl die Sprosslänge des Hauptsprosses (Abb. 3-17A) als auch der Rosettendurchmesser (Abb. 3-17B) der Komplementationslinien zeigten keinen Unterschied zu Wildtyppflanzen. Auch auf Genexpressionsebene wurde der *cpk28*-Phänotyp durch Expression aktiven CPK28-Proteins revertiert, es konnte keine erhöhte Transkriptmenge für *NST1* und *NST3* verglichen mit dem Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3-17C).

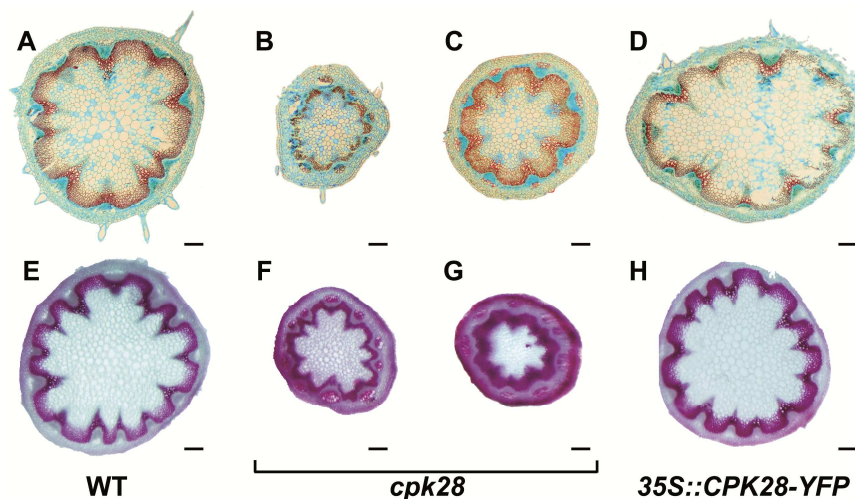


Abbildung 3-18: Reversion des *cpk28*-Phänotyps im sekundären Dickenwachstum durch Expression von aktivem CPK28-Protein (46 Tage LD). Querschnitte durch das basale Internodium in Wildtyp (A,E), zwei unterschiedliche Ausprägungen der *cpk28*-Mutanten (B,F bzw. C,G) und Querschnitt der Komplementationslinie 35S::CPK28-YFP (D,H). Färbungen der Mikrotomschnitte wurden mit Astrablau (Cellulose) und Safraninrot (Lignin) (A-D) durchgeführt, Handschnitte (E-F) wurden mit Phloroglucinol (Lignin) gefärbt. Maßstab = 100 μ m.

Auch die zelltypspezifischen Anomalien in der Sprossanatomie von *cpk28* konnten durch Expression von aktivem CPK28-Protein in *cpk28-1* revertiert werden. Querschnitte durch das basale Internodium des Sprosses und anschließende Astrablau/Safranin-Färbung (Abb. 3-18A-D) und auch Ligninfärbung mit Phloroglucinol in Handschnitten (Abb. 3-18E-H) zeigten eine wildtyp-ähnliche Zellanatomie in der Komplementationslinie *35S::CPK28-YFP*. Der Durchmesser der basalen Internodie entsprach ungefähr dem des Wildtypsprosses und die vorzeitige Lignifizierung der Phloemfasern, wie in *cpk28* zu sehen, wurde durch Expression der aktiven Kinase komplett aufgehoben.

3.1.5.2. Komplementation durch gewebespezifische Expression von CPK28

Die gewebespezifische Lokalisation der CK28 in der Vaskulatur und im meristematischen Gewebe (siehe *pCPK28::GUS*-Analysen, Abbildung 3-14) lässt auf ein kontrolliertes, begrenztes Expressionsprofil schließen. Die Bedeutung dieser zelltypspezifischen Expression für die CPK28-Funktion in der Sprossentwicklung sollte in Komplementationsanalysen mit räumlich-begrenzter Expression der CPK28 untersucht werden. Hierzu wurde Wildtyp-CPK28 unter der Kontrolle der gewebespezifischen Promotoren *pKNAT1* und *pSUC2* auf die Fähigkeit zur Reversion des *cpk28*-Phänotyps untersucht. *pKNAT1* ist im Sprossapikalmeristem und in den Cortexzellen des Sprosses aktiv (Lincoln *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu sind Proteine unter der Kontrolle des *SUC2*-Promotors spezifisch in den Phloem-Geleitzellen lokalisiert (Imlau *et al.* 1999). Dieses Expressionsprofil überlappt nicht mit dem hier beschriebenen Muster für den *CPK28*-Promotor (3.1.4.1.). Die nachfolgend analysierten transgenen *Arabidopsis*-Linien wurden von Sören Werner im Rahmen seiner Diplomarbeit unter Betreuung von Dr. Julia Legen hergestellt.

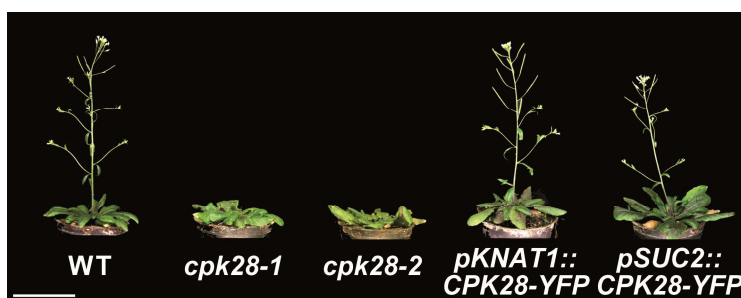


Abbildung 3-19: Komplementation des *cpk28*-Phänotyps durch gewebespezifische Expression von CPK28. Transgene *cpk28-1*-Pflanzen exprimieren YFP-markiertes CPK28-Protein unter dem *pKNAT1*- (*pKNAT1::CPK28-YFP*) bzw. *pSUC2*-Promotor (*pSUC2::CPK28-YFP*). Repräsentative Komplementation für mindestens zwei unabhängige Linien pro Konstrukt. Maßstab = 5 cm.

Interessanterweise genügte die lokal-begrenzte Expression in beiden gewebespezifischen Komplementationslinien, um den *cpk28*-Phänotyp zu revertieren (Abb. 3-19). Wildtyp-gleiche Sprosselongation konnte sowohl durch meristematische als auch durch phloem-spezifische Expression der CPK28 wiederhergestellt werden.

Dieses Ergebnis konnte auch durch die Analyse der Genexpression in den untersuchten Komplementationslinien bestätigt werden (Abb. 3-20). Die erhöhte Transkription der *NST*-

Transkriptionsfaktoren in *cpk28* war sowohl in *pKNAT1::CPK28* als auch in *pSUC2::CPK28* auf Wildtypniveau reduziert.

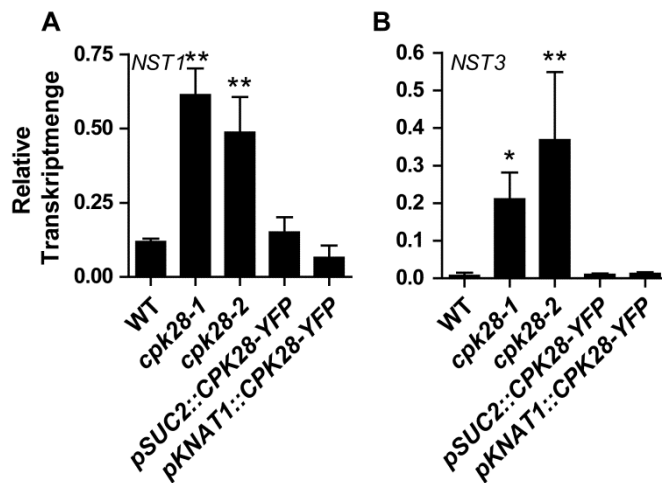


Abbildung 3-20: Genexpression von *NST1* (A) und *NST3* (B) in Wildtyp, *cpk28*-Insertionslinien und *pSUC2::CPK28-YFP* bzw. *pKNAT1::CPK28-YFP* (31 Tage LD), analysiert per qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (Statistische Analyse mittels *t*-test; signifikante Unterschiede * = P < 0,05, ** = P < 0,01).

3.1.5.3. Komplementation durch Veränderung der subzellulären Lokalisation

Auch die subzelluläre Lokalisation von Proteinen kann einen wichtigen Faktor für die Protein-Funktionalität darstellen. Aus diesem Grund wurde die delokalisierte Version der CPK28, CPK28-G2A (Lokalisierung siehe Abbildung 3-15), auf ihre Fähigkeit zur Komplementation des *cpk28*-Phänotyps untersucht (Abb. 3-21).

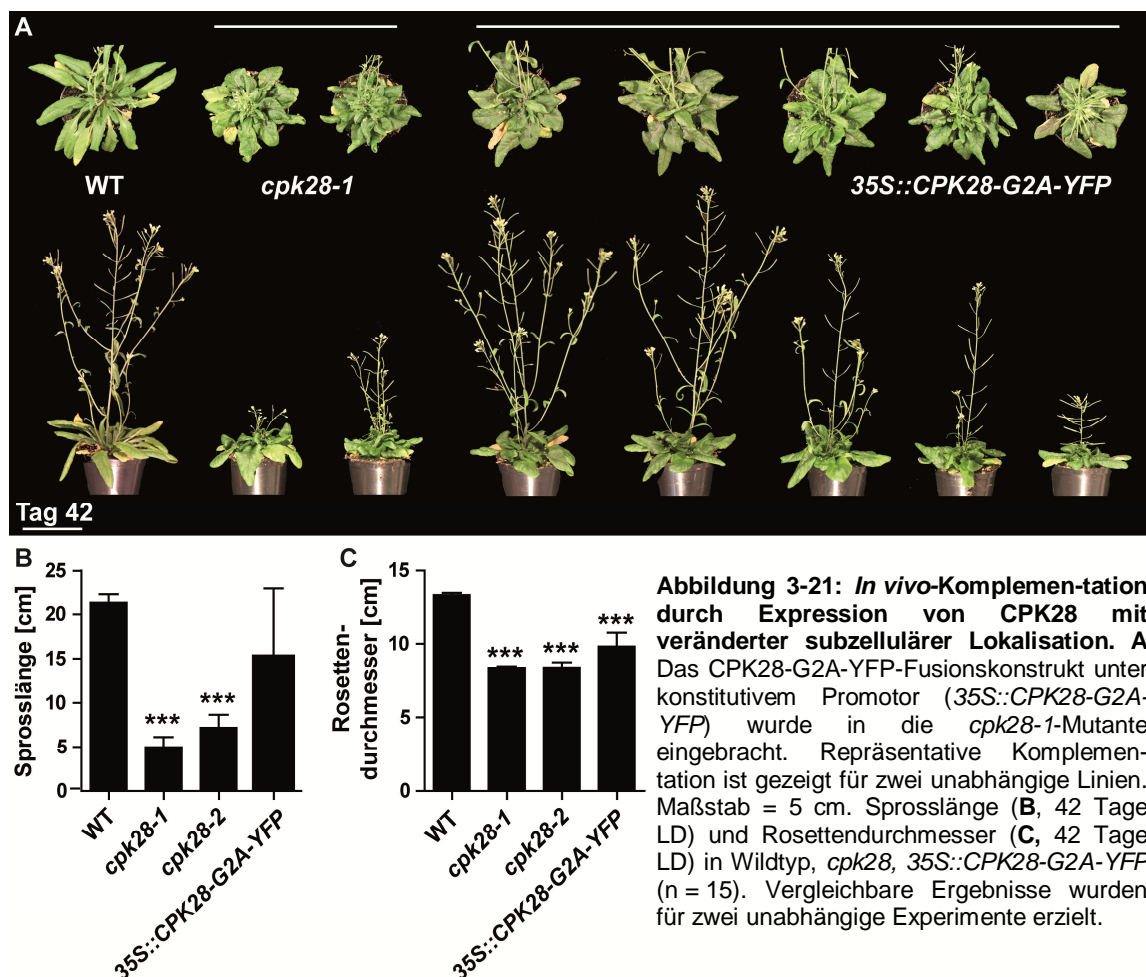


Abbildung 3-21: *In vivo*-Komplementation durch Expression von CPK28 mit veränderter subzellulärer Lokalisation. A Das CPK28-G2A-YFP-Fusionskonstrukt unter konstitutivem Promotor (*35S::CPK28-G2A-YFP*) wurde in die *cpk28-1*-Mutante eingebracht. Repräsentative Komplementation ist gezeigt für zwei unabhängige Linien. Maßstab = 5 cm. Sprosslänge (B, 42 Tage LD) und Rosettendurchmesser (C, 42 Tage LD) in Wildtyp, *cpk28*, *35S::CPK28-G2A-YFP* (n = 15). Vergleichbare Ergebnisse wurden für zwei unabhängige Experimente erzielt.

Die Untersuchung der CPK28-G2A-Komplementationslinien unterstrich die wichtige Funktion der subzellulären Lokalisation für die *in vivo*-Aktivität von CPK28. Linien mit Überexpression des CPK28-G2A-Proteins zeigten zwar eine verbesserte Fähigkeit zur Sprosselongation (Abb. 3-21A,B), jedoch mit großer Varianz der Sprosslänge (Abb. 3-21A zeigt fünf CPK28-G2A-Pflanzen aus gleichen Anzuchtbedingungen). Die phänotypischen Ausprägungen des CPK28-Funktionsverlusts konnten aber nicht gänzlich revertiert werden. Die Deformation der Blätter im reproduktiven Stadium (Abb. 3-21A, obere Reihe) und die Reduktion des Rosettendurchmessers (Abb. 3-21C) waren trotz Expression aktiven CPK28-Proteins stark ausgeprägt.

3.1.5.4. Komplementation durch verkürzte, konstitutiv-aktive CPK28

Wie im Verlauf dieser Arbeit gezeigt stellt die verkürzte, nur aus variabler und Kinasedomäne bestehende Protein-Version CPK28-VK eine konstitutiv-aktive Proteinvariante dar. Aktive und inaktive VK-Varianten wurden hinsichtlich der Komplementation des *cpk28*-Phänotyps untersucht, um die Bedeutung der calcium-abhängigen Regulierung für die *in vivo*-Funktion der CPK28 zu klären.

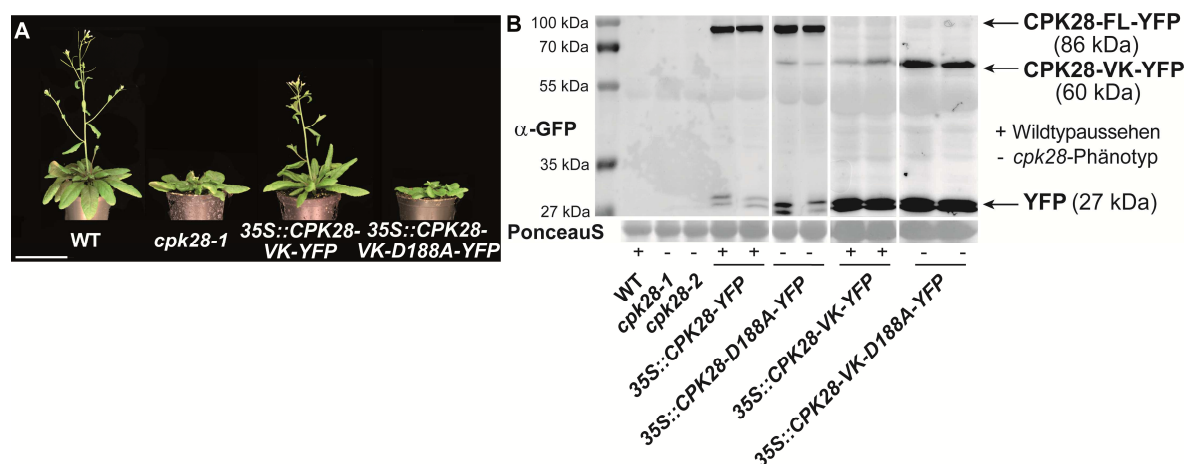


Abbildung 3-22: *In vivo*-Komplementation durch Expression der konstitutiv-aktiven CPK28. **A** CPK28-VK-YFP-Fusionskonstrukte unter dem 35S-Promotor wurden in die *cpk28-1*-Mutante eingebracht ($35S::CPK28-VK-YFP$ und $35S::CPK28-VK-D188A-YFP$). Repräsentative Komplementation für zwei unabhängige Linien pro Konstrukt. Maßstab = 5 cm. **B** Proteinexpressionslevel der CPK28 in Wildtyp, *cpk28*, $35S::CPK28-YFP$, $35S::CPK28-D188A-YFP$, $35S::CPK28-VK-YFP$ und $35S::CPK28-VK-D188A-YFP$ (40 Tage LD). Proteine wurden extrahiert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot mit einem α -GFP-Antikörper analysiert. Zwei Linien per Konstrukt sind dargestellt, unterschiedliche Gele werden durch weiße Linien angezeigt. Das Pluszeichen bedeutet Wildtypaussehen, ein Minuszeichen steht für Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps.

Hierbei zeigte sich das gleiche Resultat wie auch schon in den Komplementationsanalysen mit dem CPK28-Vollängenkonstrukt. Die Expression von aktiver CPK28, egal ob konstitutiv-aktiv (VK) oder calcium-regulierbar (FL, Abb. 3-16), führte zur Reversion des Phänotyps (Abb. 3-22A). Bei Expression inaktiven CPK28-Proteins konnte keine morphologische Veränderung im Vergleich zur Ausgangslinie *cpk28-1* festgestellt werden.

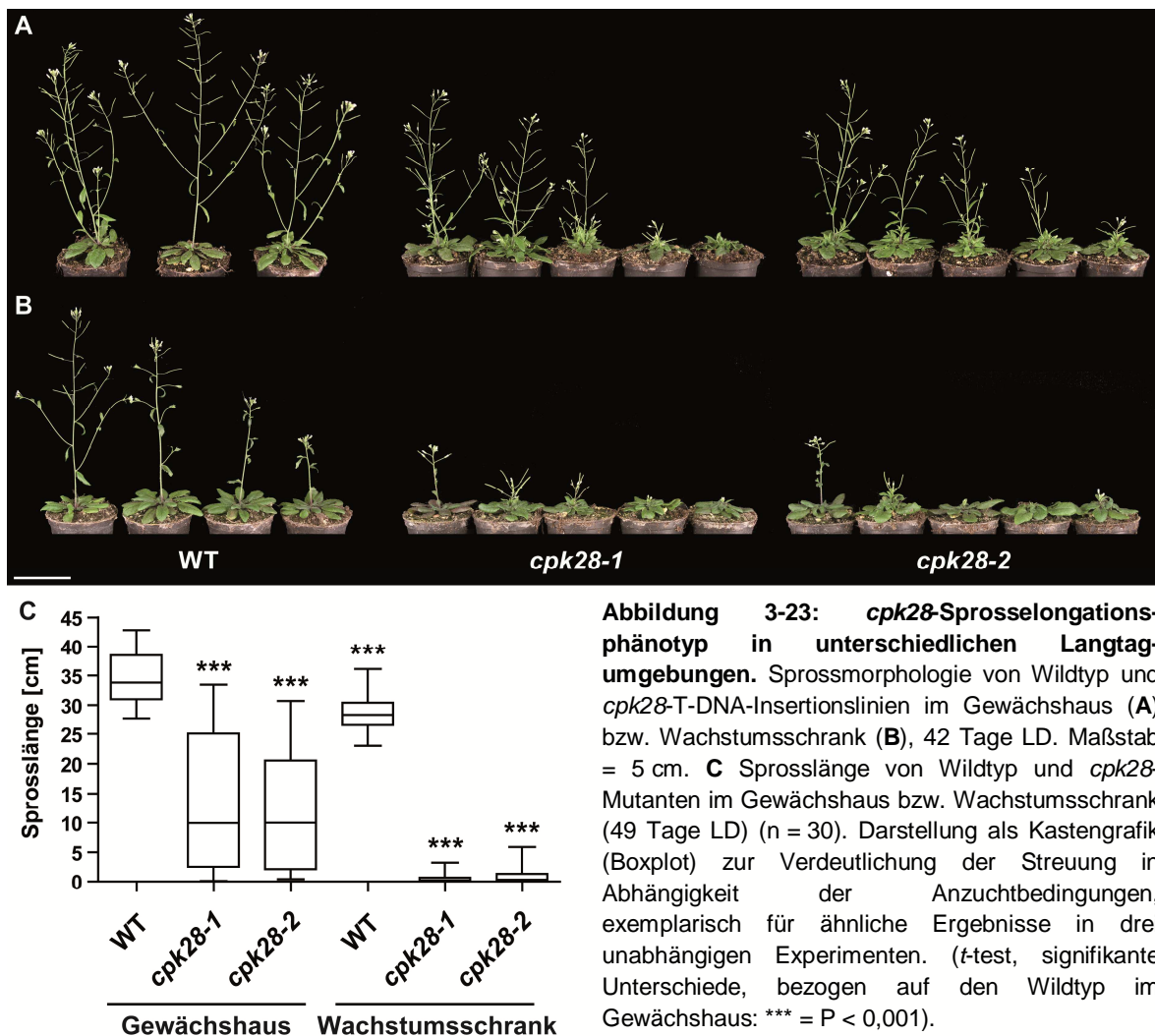
Auffällig bei der Analyse der Proteingehalte war die Tatsache, dass die Proteinexpressionsstärke von CPK28-VK-YFP unter der Kontrolle des 35-Promotors merklich geringer war als für das inaktive VK-Protein oder die Vollängenkonstrukte beobachtet (Abb. 3-22B).

3.1.6. Penetranz des *cpk28*-Phänotyps

Während der Arbeiten mit den *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien wurde starke Abhängigkeit der Penetranz des *cpk28*-Phänotyps von den Anzuchtbedingungen, nämlich der Wahl der Anzuchtammer bzw. des Pflanzenwachstumsschranks festgestellt. Im Folgenden werden Untersuchungen zur Ursache dieser unterschiedlichen Ausprägung dargelegt.

3.1.6.1. Wachstumsphänotyp von *cpk28* in unterschiedlichen Langtagbedingungen (Percival vs. Gewächshaus)

Um die Unterschiede in der Penetranz des *cpk28*-Phänotyps zu dokumentieren, wurden Pflanzen jeweils im Wachstumsschrank (Percival AR-66L/SPLIT) und im Gewächshaus angezogen und hinsichtlich der Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps untersucht.



Hier wurde eine drastisch erhöhte Varianz der Sprosselongation von *cpk28* bei Anzucht im Gewächshaus festgestellt (Abb. 3-23). Für beide *cpk28*-Linien wurden große morphologische Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen des gleichen Genotyps (aus gleichen Samenchargen) beobachtet. Anzucht im Wachstumsschrank vermittelte ein deutlich einheitlicheres Erscheinungsbild der Individuen eines Genotyps, weshalb, falls nicht anders angegeben, für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche die Anzucht im Percival unter LD-Bedingungen gewählt wurde. Die Darstellung als Kastengrafik (Boxplot) in Abbildung 3-23B verdeutlicht die größere Streuung der individuellen Sprosslängenwerte in den *cpk28*-Linien im Gewächshaus im Gegensatz zur Lichtschrankanzucht anhand der Größe der Boxen (Bereich der mittleren 50 Prozent der Werte) und der Länge der Antennen (größter bzw. kleinster Wert). Allgemein wuchsen die Pflanzen im Gewächshaus etwas schneller als im Wachstumsschrank, erkennbar an der größeren Sprosslänge im Wildtyp zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 3-23B).

Für unterschiedliche *cpk28*-Saatgut-Chargen konnten kein Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps abhängig vom Saatgut-Alter (geerntet von 2005 bis 2011) oder unterschiedlichen Anzuchtbedingungen (Saatgut aus reiner LD-Anzucht bzw. aus SD- und anschließender LD-Anzucht) festgestellt werden (nicht gezeigt). Ein epigenetischer Einfluss durch Anzuchtbedingungen der Vorgeneration auf die Penetranz des Phänotyps wird aufgrund dieser Beobachtung ausgeschlossen.

3.1.6.2. Einfluss unterschiedlicher Lichtqualitäten auf *cpk28*

Ein essentieller Faktor zur Pflanzenanzucht, der sich in der Architektur der Pflanzen niederschlägt, ist die Versorgung mit Licht zur Photosynthese, wobei neben der Photoperiode (SD- bzw. LD-Bedingungen) auch Lichtintensität und Zusammensetzung des Farbspektrums des weißen Lichts Einfluss auf die Morphologie der Pflanzen haben (Kami *et al.* 2010). Im Folgenden werden Untersuchungen beschrieben, die eine mögliche Auswirkung unterschiedlicher Lichtqualitäten auf die Morphologie von *cpk28* analysieren und damit Hinweise auf die Rolle von CPK28 in der Wahrnehmung oder Verarbeitung von Lichtqualitäten geben könnten.

3.1.6.2.1. Hypocotylelongation

Zunächst wurde die Antwort der *cpk28*-Mutanten auf die Lichtqualitäten Blau, Rot und Dunkelrot in Hypocotylelongationsexperimenten untersucht. Die Experimente wurden zum einen in Zusammenarbeit mit Dr. Mark Aurel Schöttler am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm, zum anderen unter Anweisung von Dr. Kenji Hashimoto in der AG Kudla an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in speziellen, mit LED-Quellen ausgestatteten Lichtschränken durchgeführt.

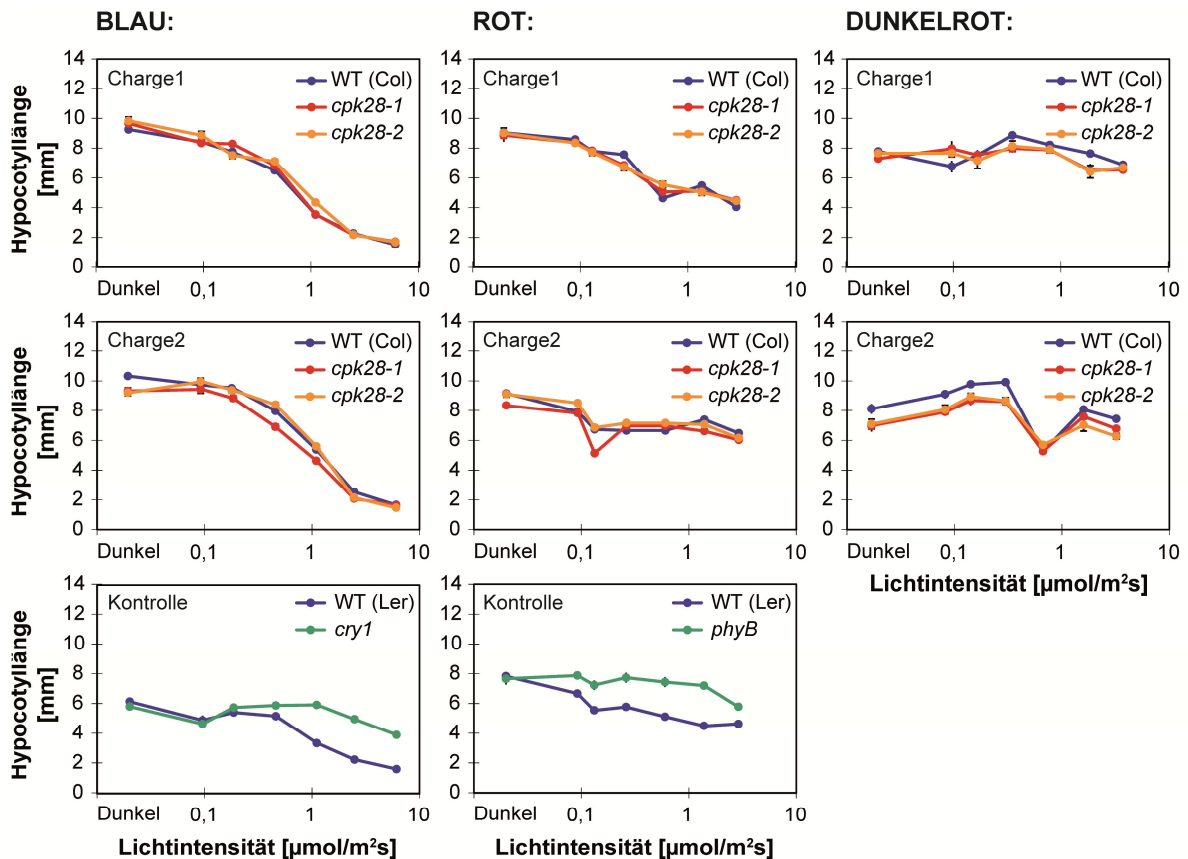


Abbildung 3-24: Hypocotylelongation in unterschiedlichen Lichtqualitäten. Je zwei unabhängige Samenchargen pro Genotyp (WT und *cpk28*, außerdem Kontrollplatten mit entsprechenden Photorezeptor-Mutanten) wurden auf nassem Filterpapier in Petrischalen ausgelegt und zwei Tage bei 4°C inkubiert. Nach drei Stunden Belichtung zur Keimungsinduktion und weiterer Dunkelinkubation für 21 Stunden wurden Stapel von je sieben Platten (zur Generierung unterschiedlicher Lichtintensitäten) in Blau- ($\lambda = 440$ nm), Rot- ($\lambda = 660$ nm) und Dunkelrotlicht ($\lambda = 715$ nm) und im Dunkeln für drei Tage inkubiert. Die Vermessung der Hypocotylelongation erfolgte mit dem Programm ImageJ. Werte repräsentieren den Durchschnitt \pm Standardfehler von 50 Keimlingen pro Genotyp, Lichtqualität und -intensität. Ähnliche Resultate wurden in zwei unabhängigen Experimenten erzielt.

In diesen Experimenten konnte für die *cpk28*-Mutanten keine veränderte Antwort in den unterschiedlichen Lichtqualitäten beobachtet werden (Abb. 3-24). Wie in der Literatur beschrieben (Fankhauser und Casal 2004), wurde ausgehend von der Hypocotylelongation im Dunkeln für Blau- und Rotlicht mit zunehmender Lichtintensität abnehmende Hypocotylelongation detektiert. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede im Verhalten der *cpk28*-Linien verglichen zum Wildtyp. Als Kontrollen (untere Teildiagramme) dienten hierbei die entsprechenden Photorezeptormutanten zur Wahrnehmung der jeweiligen Lichtqualität (*cry1* für Blaulicht bzw. *phyB* für Rotlicht (Fankhauser und Chory 1997)), die je nach Lichtintensität aufgrund fehlender Lichtperzeption erhöhte Hypocotylelongation im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Auch in der Wahrnehmung von dunkelrotem Licht konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *cpk28* beobachtet werden, wobei hier keine Rezeptormutante als Kontrolle zur Verfügung stand und der korrekte Versuchsablauf somit nicht bestätigt werden konnte.

3.1.6.2.2. Der *cpk28*-Phänotyp unter verschiedenen Lichtqualitäten

Aufgrund der stadienspezifischen Ausbildung des *cpk28*-Phänotyps wurde nicht nur der Einfluss der Lichtqualität auf Keimlinge, ein möglicherweise zu frühes Stadium für die Ausbildung einer *cpk28*-abhängigen Veränderung, überprüft, sondern auch deren Effekt auf die morphologischen Veränderungen des *cpk28*-Phänotyps. In Kooperation mit Dr. Mark Aurel Schöttler wurden Experimente zur Pflanzenanzucht in LED-Wachstumsschränken unter den Lichtqualitäten Blau (440 nm) bzw. Rot (660 nm) und mit LEDs als Weißlichtquelle bis zur Reproduktionsphase durchgeführt. Im Weißlicht erfolgte die Anzucht unter LD-Bedingungen mit $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Lichtintensität. Die maximal mögliche Lichtintensität für Blau- bzw. Rotlicht betrug $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und erfolgte unter kontinuierlicher Belichtung (Guo *et al.* 1998). Leider war die maximale Intensität des Lichtschrankes für Dunkelrot mit nur knapp $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ zu gering, um Pflanzenanzucht bis zur Blüte unter diesen Bedingungen zu testen. Die Auswertung der Experimente beschränkt sich auf die Beschreibung der Pflanzenmorphologie anhand von Bildern, da keine detaillierten Messungen der *cpk28*-Merkmale durchgeführt wurden und aus Zeit- und Platzgründen eine Wiederholung der Experimente im LED-Wachstumsschrank nicht möglich war.

Abbildung 3-25 zeigt, dass die Anzucht von *cpk28* unter allen LED-Bedingungen generell zu einem schwächeren morphologischen *cpk28*-Phänotyp als im normalen Wachstumsschrank führte. Weißlicht-LED-Belichtung im LD-Regime rief einen mit den sonst verwendeten Bedingungen vergleichbaren Blühzeitpunkt hervor, Pflanzen an Tag 39 befanden sich voll in der reproduktiven Phase. Verglichen mit dem Wildtyp wies *cpk28* leicht kürzere Sprosse, jedoch keinen stringenten Phänotyp auf. Auch bei Blaulicht-Belichtung konnte kein gravierender Effekt auf die *cpk28*-Morphologie detektiert werden (Abb. 3-25), hier erscheinen die Unterschiede zum Wildtyp noch marginaler. Auffällig war das schnelle Wachstum unter Blaulichtbedingungen, die dargestellten Pflanzen sind mit 27 Tagen deutlich weiterentwickelt als in allen in dieser Arbeit gezeigten Weißlichtbedingungen. Die größten phänotypischen Unterschiede zwischen Wildtyp und *cpk28* wurden unter konstanter Rotlichtillumination erreicht. Die Reduktion der Sprosslänge in beiden *cpk28*-Linien ist hier deutlich zu erkennen. Wie beschrieben wuchsen die Pflanzen unter Rotlichtbedingungen sehr langsam (Eskins 1992) und die reproduktive Phase setzte erst sehr spät ein. Die gezeigten Pflanzen waren 78 Tage alt und wiesen deutliche morphologische Deformationen, Stress- und Seneszenzanzeichen auf, was Rotlicht alleine als ungeeignete Bedingung für die Pflanzenentwicklung ausweist.

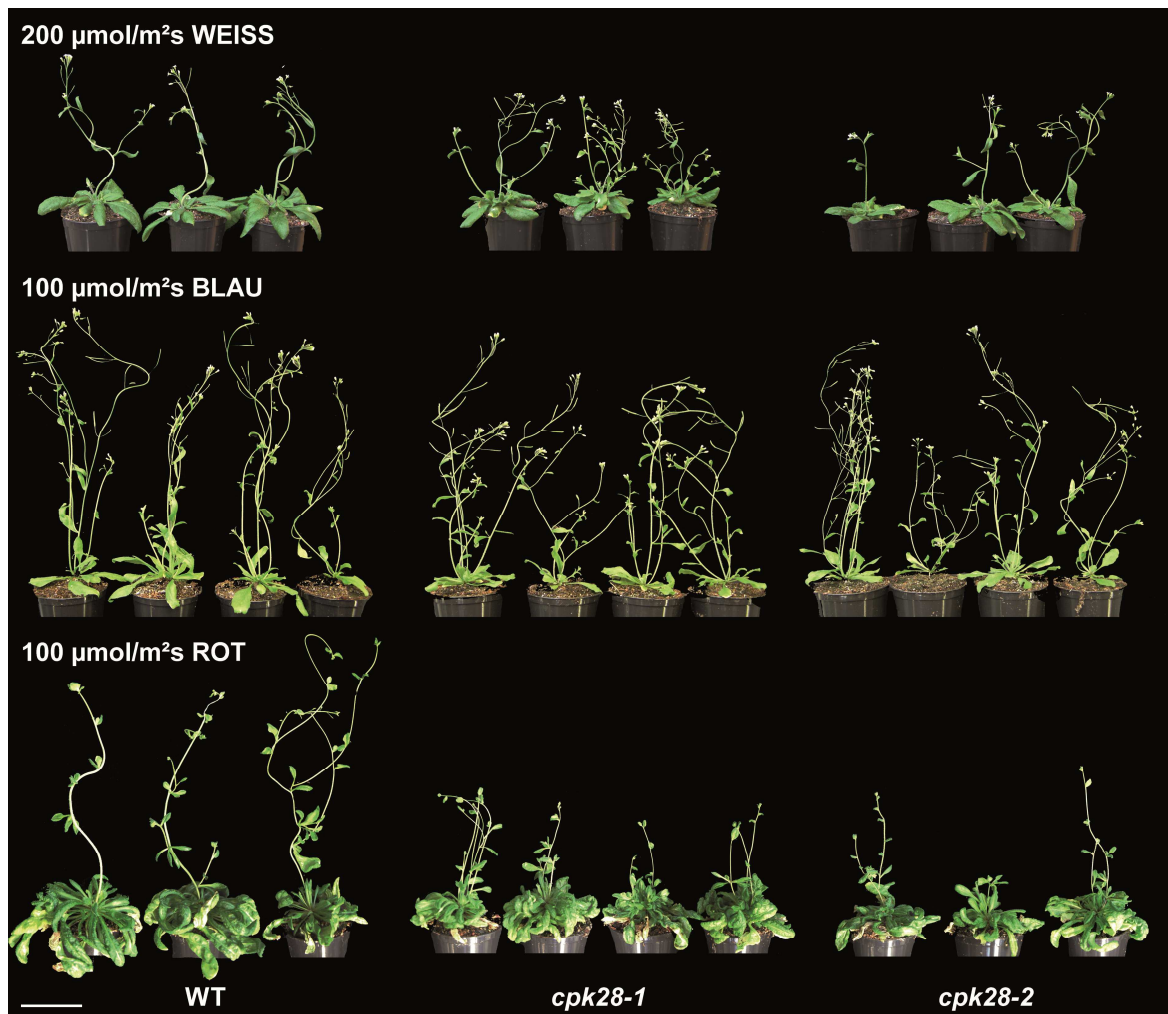


Abbildung 3-25: *cpk28*-Sprosselongationsphänotyp in unterschiedlichen Lichtqualitäten. Sprossmorphologie von Wildtyp und *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien in Weißlicht (39 Tage LD mit LED-Lampen im CLF-FloraLED-Wachstumsschrank), in Blaulicht (27 Tage kontinuierliches Licht mit LED-Lampen, $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) und in Rotlicht (78 Tage kontinuierliches Licht mit LED-Lampen, $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Maßstab = 5 cm.

Als weitere mögliche Anzuchtparameter, die neben Lichtqualität für eine unterschiedliche Penetranz des *cpk28*-Phänotyps in Frage kamen, wurden Lichtintensität und Anzuchttemperatur untersucht. In beiden Fällen konnten keine konsistenten Unterschiede, in verbesserter Sprosselongation der *cpk28* resultierend, beobachtet werden, weshalb auf die Darstellung in Bildern verzichtet wird.

3.2. Zusammenhang zwischen CPK28 und dem Hormonhaushalt in *A. thaliana*

3.2.1. Analyse der Bedeutung von CPK28 im Gibberellin-Haushalt

3.2.1.1. Phänotypische Analyse von *cpk28* nach externer Hormongabe

Mutanten im GA-Metabolismus und der Signaltransduktion werden oft als kleinwüchsige Pflanzen mit verminderter Sprosselongation beschrieben (Koornneef und Vanderveen 1980), welche durch exogene Applikation von Gibberellin revertiert werden kann. Aus

diesem Grund wurde der Einfluss von exogenem GA auf die Sprosselongation der *cpk28*-Mutanten untersucht. Hierzu wurden die Pflanzen ab der Aussaat jeden zweiten bis dritten Tag mit 100 μM GA₃, einem kommerziell erhältlichen, bioaktiven Gibberellin (Yamaguchi 2008) besprüht und dessen Einfluss auf das Wachstum der *cpk28*-Mutanten analysiert.

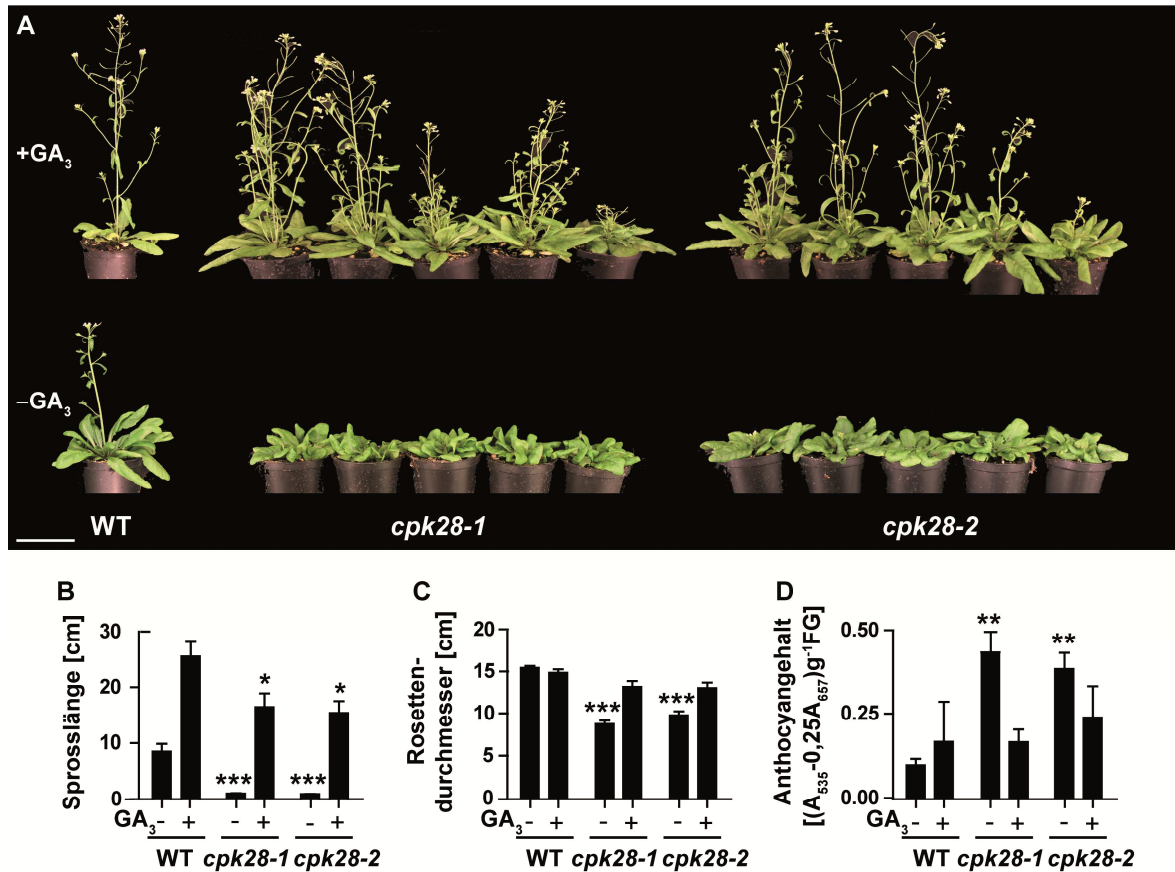


Abbildung 3-26: Einfluss externer Gibberellinsäuregabe auf *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien. **A** Morphologie nach Gibberellinsäurebehandlung von Wildtyp und *cpk28*-Mutanten. Pflanzen wurden jeden zweiten bis dritten Tag mit 100 μM GA₃ (+) oder 0,95 % EtOH (-) behandelt und auf Ausbildung des *cpk28*-Phänotyps untersucht (42 Tage LD). Maßstab = 5 cm. **B – D** Partielle Reversion der phänotypischen *cpk28*-Merkmale: Sprosslänge (n = 15) (**B**), Rosettendurchmesser (n = 15) (**C**) und Anthocyanengehalt (n = 3) (**D**) in Wildtyp und *cpk28*-Linien. Werte stellen den Durchschnitt n biologischer Replikate \pm Standardfehler dar. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten erzielt (*t*-test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$).

Die wiederholte Gabe von 100 μM GA₃ führte in beiden *cpk28*-Allelen zu einer partiellen Reversion des zuvor beschriebenen Wachstumsphänotyps (Abb. 3-26). Nach GA-Behandlung konnte eine Wiederherstellung der Sprosselongation bis zu ca. 75 % der entsprechend behandelten Wildtyppflanzen beobachtet werden (Abb. 3-26A,B). Ebenso wurde eine GA-abhängige Steigerung des Rosettendurchmessers bis zu 90 % des Wildtypwertes erreicht (Abb. 3-26C). Außerdem wurde der erhöhte Anthocyanengehalt in *cpk28*-Mutanten durch exogenes GA auf das Wildtypniveau reduziert, während Pflanzen mit Kontrollbehandlung weiterhin gesteigerte Anthocyanlevel zeigten (Abb. 3-26D).

Der mögliche Einfluss anderer Pflanzenhormone wie Auxin oder Brassinosteroiden, die ebenso wie Gibberellin im Zusammenhang mit Zellelongationsereignissen in Pflanzen stehen, wurde in weiteren Applikationsexperimenten untersucht.

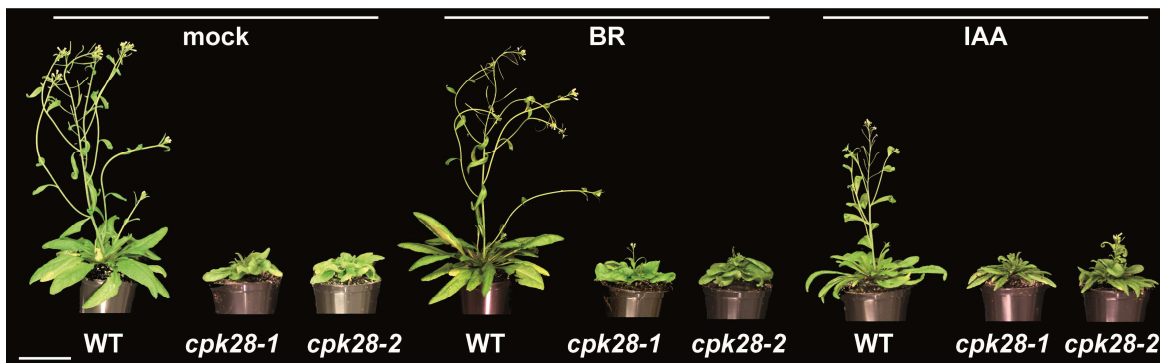


Abbildung 3-27: Morphologie von Wildtyp und *cpk28* unter Gabe weiterer Pflanzenhormone (45 Tage LD). Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei 22°C auf Erde angezogen. Hormonbehandlungen wurden jeden zweiten oder dritten Tag per Sprayapplikation mit entweder 0,95 % EtOH (mock), 100 µM Epibrassinolid (BR) oder 100 µM Indol-3-essigsäure (IAA) durchgeführt. Maßstab = 5 cm.

Hierbei konnte nach externer Gabe kein positiver Einfluss der untersuchten Hormone Auxin (IAA) oder Epibrassinolid (BR) auf das Wachstum der *cpk28*-Mutanten festgestellt werden (Abb. 3-27). Keines dieser Hormone zeigte die durch GA-Gabe hervorgerufene Reversion der Sprosselongation in *cpk28*.

3.2.1.2. Expressionsanalyse von Markergenen des Gibberellinsäuremetabolismus'

Die partielle Reversion des *cpk28*-Wachstumsdefekts durch GA-Gabe deutete auf eine mögliche Störung des Gibberellinsäuremetabolismus' in den *cpk28*-Mutanten hin. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die transkriptionelle Regulation von Genen des GA-Metabolismus' untersucht. Die Gene *GA20-Oxidase1* (*GA20ox1*) und *GA3-Oxidase1* (*GA3ox1*) stellen Indikatoren für den Gehalt an bioaktivem GA dar, das der Pflanze zur Verfügung steht (Hedden und Phillips 2000, Fukazawa *et al.* 2010). Die Genexpression wurde zunächst in Wildtyp und *cpk28-1* in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (10, 20, 27, 31 und 35 Tage LD) mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 3-28).

In frühen Entwicklungsstadien (bis Tag 27) konnten keine signifikanten Unterschiede der *GA20ox1*- und *GA3ox1*-Transkriptlevel zwischen Wildtyp und *cpk28-1* festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde nach dem Übergang von vegetativer zu generativer Phase um Tag 30 eine Reduktion der Genexpression von *GA20ox1* (35 Tage LD) (Abb. 3-28A) und *GA3ox1* in *cpk28*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (31 und 35 Tage LD, Abb. 3-28B).

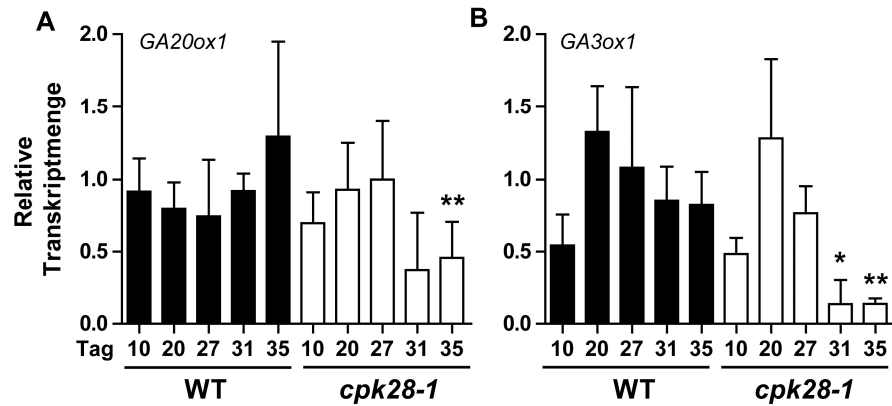


Abbildung 3-28: Genexpression von Markergenen des Gibberellinsäuremetabolismus. Zeitabhängige Entwicklung der Genexpression von *GA20ox1* (A) und *GA3ox1* (B) in Wildtyp und *cpk28-1*, analysiert per qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (*t*-test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$). Wiederholung des Experiments zeigte ähnliche Resultate.

Diese Unterschiede in der Genregulation wurden sowohl im zweiten *cpk28*-Allel als auch den Komplementationslinien weiter untersucht. Nachdem die Qualität der untersuchten RNA bzw. cDNA mit zunehmendem Alter des Pflanzenmaterials merklich abnahm (Daten nicht gezeigt) und somit die Effektivität der qRT-PCR beeinflusste, wurden die nachfolgenden Analysen nur zum Zeitpunkt 31 Tage LD durchgeführt.

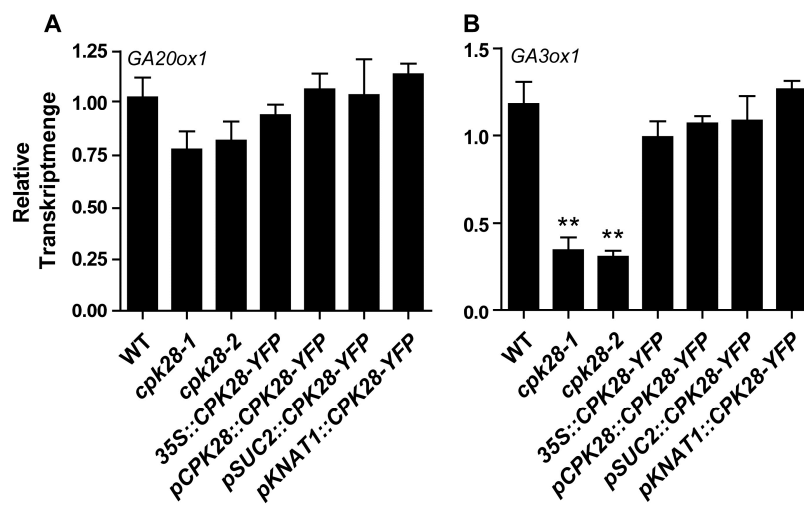


Abbildung 3-29: Genexpression von *GA20ox1* (A) und *GA3ox1* (B) in Wildtyp, *cpk28* und Komplementationslinien (31 Tage LD), analysiert per qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (Statistische Analyse mittels *t*-test; signifikante Unterschiede ** = $P < 0,01$). Wiederholung des Experiments zeigte ähnliche Resultate.

Die Expressions-Deregulation der untersuchten Markergene des GA-Metabolismus konnte für das zweite *cpk28*-Allel bestätigt werden (Abb. 3-29), die Reduktion der *GA3ox1*-Transkriptmenge in *cpk28-2* an Tag 31 war mit der in *cpk28-1* vergleichbar. Ebenso konnte für einige der untersuchten Komplementationslinien, die aktive CPK28 exprimierten und eine phänotypische Reversion des *cpk28*-Phänotyps zeigten (*35S::CPK28-YFP*, *pCPK28::CPK28-YFP* und auch *pKNAT1::CPK28-YFP* und *pSUC2::CPK28-YFP*), Transkriptmengen der GA-Markergene ähnlich dem Wildtyplevel festgestellt werden.

3.2.1.3. Analyse früher gibberellinsäure-abhängiger Wachstumsprozesse in *cpk28*

Um den möglichen Einfluss der CPK28 auf andere gibberellinsäure-abhängige Prozesse in der Pflanze zu untersuchen, wurden die *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien sowohl auf ihre Keimungsfähigkeit als auch auf Hypocotylelongation in unterschiedlichen Lichtregimes untersucht. Diese Vorgänge stellen zwei GA-abhängige, frühe Ereignisse im vegetativen Entwicklungsstadium der Pflanze dar. Die Keimungsrate von WT und *cpk28* wurde in Plattenexperimenten quantifiziert. Hierzu wurden unterschiedliche Samenchargen aller Genotypen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht und die Rate des Austretens der Keimwurzel aus der Samenschale bestimmt. In Hypocotylelongationsversuchen wurde die Rolle der CPK28 in diesem GA-abhängigen Prozess in Licht- und Dunkelexperimenten und zusätzlich nach Gabe von externem Gibberellin (GA_3) bzw. dem GA-Biosynthese-Inhibitor Paclobutrazol (PAC) untersucht.

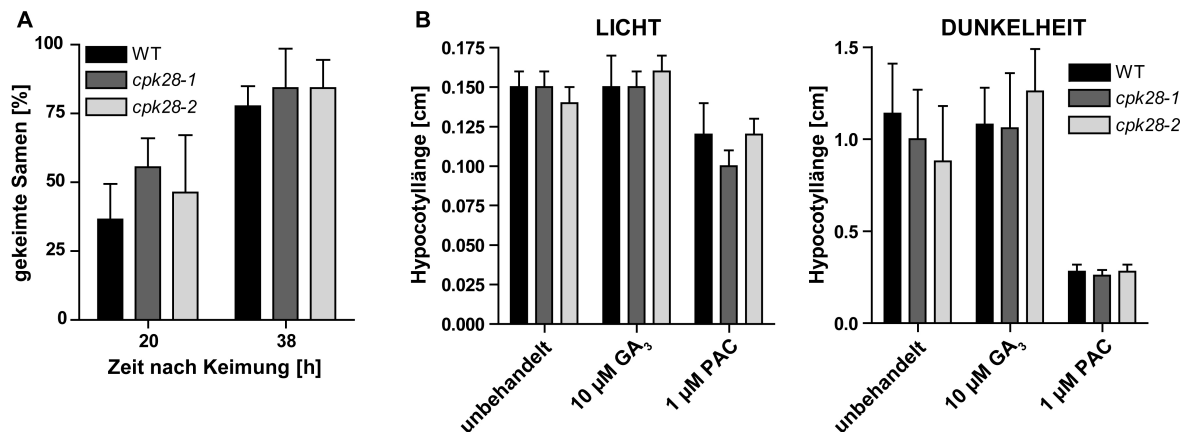


Abbildung 3-30: Gibberellin-abhängige Prozesse im vegetativen Stadium der Pflanze. (A) Quantifizierung der Keimungsrate von Wildtyp und *cpk28*. Sterilisierte Samen wurden zwei Tage bei 4°C und anschließend unter Langtagbedingungen horizontal auf 0,5x MS-Platten inkubiert. Als Maß für die Keimungsrate diente das Austreten der Keimwurzel aus der Samenschale 20 bzw. 38 Stunden nach Keimung. Werte repräsentieren den Durchschnitt \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Samenchargen ($n \geq 36$ pro Charge). (B) Hypocotylelongation in Wildtyp und *cpk28*. Keimlinge wurden auf 0,5x MS-Platten mit Supplementen (GA_3 = Gibberellinsäure und PAC = Paclobutrazol) für sechs Tage inkubiert (Licht = LD oder Dunkel) und Hypocotylelongation unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde bestimmt. Werte repräsentieren den Durchschnitt \pm Standardfehler von 15 Keimlingen pro Genotyp. Ähnliche Resultate wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

Beide untersuchten gibberellin-abhängigen Entwicklungsprozesse scheinen nicht von der Funktion der CPK28 beeinflusst zu sein. Die Keimungsrate in *cpk28* sowohl 20 Stunden als auch 38 Stunden nach Versuchsbeginn unterschied sich nicht von der zugehörigen Wildtyp-Samencharge (Abb. 3-30A). Nach 20 Stunden waren ca. 40-50 Prozent aller Samen gekeimt, und nach 38 Stunden wurde eine Keimungsrate von ca. 80 Prozent in Wildtyp und Mutantenlinien festgestellt. Auch die Hypocotylelongationsversuche mit sechs Tage alten Keimlingen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der *cpk28*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-30B). Unter Langtagbedingungen fand eine

deutlich reduzierte Hypocotylelongation im Vergleich zu Dunkelbedingungen statt, die Hypocotyle erreichten im Licht nur ca. ein Zehntel der Länge des Dunkelexperiments. Nach Behandlung mit Paclobutrazol reduzierte sich die Hypocotylelongation im Dunkeln etwa um das Sechsfache, im Licht konnte eine Reduktion der Länge auf ca. 80 Prozent der unbehandelten Keimlinge erzielt werden. Zusätzliche Gabe von Gibberellin resultierte sowohl in Licht als auch in Dunkelheit nicht in einer Veränderung der Hypocotylelongation.

3.2.1.4. Zusammenhang zwischen GA-Haushalt und sekundärem Dickenwachstum in *cpk28*

Im Folgenden wurde analysiert, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der CPK28-abhängigen Störung der GA-Genregulation auf der einen Seite und der Regulation des sekundären Dickenwachstums mittels *NST*-Transkriptionsfaktoren andererseits besteht. Hierzu wurden die Auswirkungen der externen Gibberellinbehandlung auf *NST*- und *GAox*-Genexpression (31 Tage LD, Abb. 3-31) und Veränderung der Sprossanatomie (42 Tage LD, Abb. 3-32) untersucht.

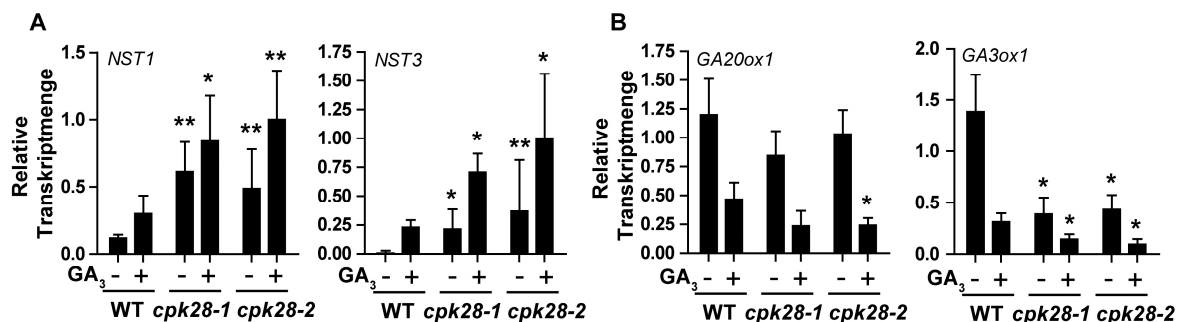


Abbildung 3-31: Genexpression in Wildtyp und *cpk28* nach Behandlung mit Gibberellinsäure. Genexpressionslevel von *NST1* und *NST3* (A) bzw. *GA-20oxidase1* (*GA20ox1*) und *GA-3oxidase1* (*GA3ox1*) (B) in WT und *cpk28* nach Behandlung mit 100 μ M GA_3 (+) oder 0,95 % EtOH (-) jeden zweiten bis dritten Tag (31 Tage LD). Werte repräsentieren den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (*t*-test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$; statistische Unterschiede werden für *cpk28* jeweils zum entsprechend gleich-behandelten Wildtyp gezeigt). Wiederholung des Experiments zeigte ähnliche Resultate.

Wie schon zuvor gezeigt (Abb. 3-12,13), konnte in unbehandelten *cpk28*-Pflanzen (-) eine Akkumulation von *NST*- und *NST3*-Transkripten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 3-31A). GA_3 -Behandlung (+) führte sowohl im Wildtyp als auch in *cpk28* zu einer Erhöhung der Transkriptmenge beider *NST*-Gene im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Hierbei war die Genexpression in *cpk28* auch nach GA_3 -Behandlung verglichen mit dem Wildtyp immer noch signifikant erhöht. Wie erwartet wurde durch die Behandlung mit exogener Gibberellinsäure die Expression der Biosynthesegene *GA20ox1* und *GA3ox1* in allen untersuchten Linien reprimiert (Abb. 3-31B). Hierbei war jedoch auch im Fall der GA_3 -Gabe noch signifikante Reduktion der *GAox*-Transkriptmengen in *cpk28* verglichen mit dem Wildtyp festzustellen.

Zusätzlich wurde die Sprossanatomie der basalen Internodie in GA- und kontrollbehandelten Wildtyp- und *cpk28*-Pflanzen untersucht (Abb. 3-32). Obwohl exogene Applikation von GA zu verbesserter Sprosselongation führte (Abb. 3-26), konnten die Anomalien der *cpk28*-Sprossanatomie durch GA-Gabe nicht revertiert werden.

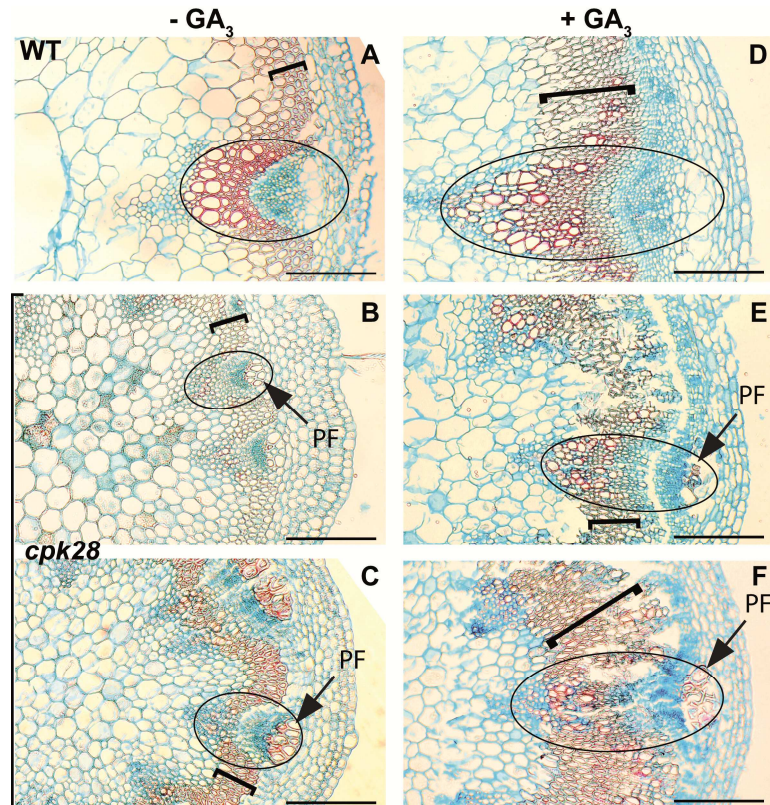


Abbildung 3-32: Sprossanatomie in Wildtyp und *cpk28* nach Gibberellinsäurebehandlung. (A-F) Hormonbehandlung mit 100 μM GA_3 oder 0,95 % EtOH jeden zweiten oder dritten Tag (42 Tage LD). Querschnitt durch das basale Internodium von Kontroll- (A) und GA_3 -behandeltem (D) WT sowie Kontroll- (B,C) und GA_3 -behandeltem (E,F) *cpk28*-Pflanzen. PF = Phloemfasern. Pfeile zeigen lignifizierte Phloemfasern und Ovale deuten Leitbündel mit weniger lignifizierten Xylemgefäßen in *cpk28* an. Färbungen der Mikrotomschnitte wurden mit Astrablau (Cellulose) und Safraninrot (Lignin) durchgeführt. Maßstab = 100 μm .

GA-Behandlung im Wildtyp führte zu verstärktem sekundärem Dickenwachstum im Wildtyp (Abb. 3-32A,D), der Bereich des interfaszikulären Kambiums mit lignifizierten Zellen (Klammer) war im Vergleich zu Kontrollpflanzen vergrößert. Dieser Effekt war auch in *cpk28*-Pflanzen nach GA-Behandlung sichtbar (Abb. 3-32B,E bzw. C,F). Sowohl die Lignifizierung der Phloemfasern (PF) als auch die Reduktion der trachealen Elemente des Xylems in den Leitbündeln (Ovale) als charakteristische Merkmale für das Fehlen der CPK28 waren auch nach Gibberellinsäure-Behandlung deutlich zu erkennen.

3.2.2. Analyse der Rolle von CPK28 im Jasmonat-Haushalt

Kurz vor Ende der aktiven Bearbeitungszeit dieser Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen CDPKs und der Regulation des Jasmonat-(JA)-Gehalts in *Nicotiana attenuata* mit Einfluss auf die Sprosselongation beschrieben (Yang *et al.* 2012a). Daraufhin wurden Experimente zur Analyse der Bedeutung von CPK28 im JA-Haushalt initiiert. Erste Ergebnisse zu Genexpressionsanalysen und Kreuzungsexperimenten, soweit sie noch im Rahmen dieser Arbeit erzielt werden konnten, werden im Folgenden beschrieben.

3.2.2.1. JA-abhängige Markergenexpression

Bereits vorhandene Proben zur Analyse der Genregulation in *cpk28*-Mutanten und Komplementationslinien wurden auf Expression unterschiedlicher JA-Markergene getestet. Die zeitabhängige Expression im Vergleich zwischen Wildtyp und *cpk28-1* konnte aufgrund der Probenknappheit nur für wenige Gene analysiert werden (Abb. 3-33).

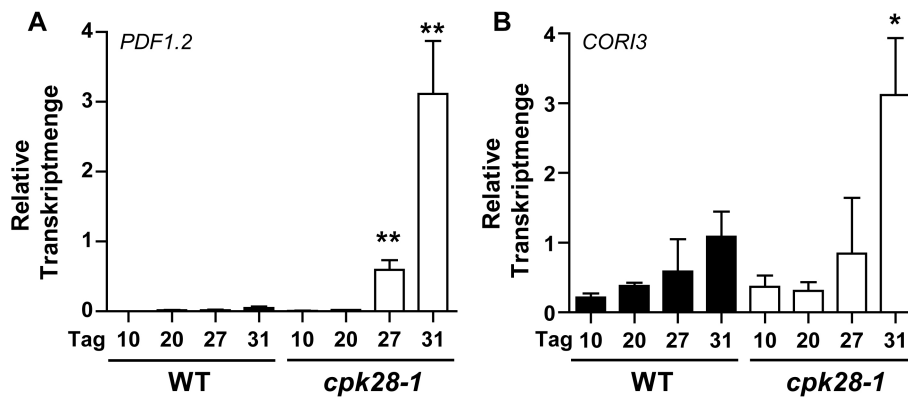


Abbildung 3-33: Zeitabhängige Genexpression von jasmonat-responsiven Markergenen. Zeitabhängige Entwicklung der Genexpression von *PDF1.2* (A) und *COR13* (B) in Wildtyp und *cpk28-1*, analysiert per qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (*t*-test, signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$).

Für zwei JA-induzierte Markergene konnte eine zeitabhängige Veränderung der Genexpression beobachtet werden. Sowohl *PDF1.2* als auch *COR13* wiesen zu Beginn der Pflanzenentwicklung dem Wildtyp ähnliche Transkriptmengen auf, während in den späteren Entwicklungsphasen, wie schon auch für andere Markergene in der *cpk28*-Entwicklung eine Deregulation der Genexpression nachgewiesen wurde. *PDF1.2* war in der Mutante mit ca. 60-facher Steigerung der Expression an Tag 27 und einer ca. 300-fachen Transkriptakkumulation an Tag 31 im Vergleich zum Wildtyp stark hochreguliert (Abb. 3-33A). Auch *COR13* wies zumindest an Tag 31 erhöhte Genexpression im Vergleich zum Wildtyp auf, wobei die Transkriptmenge in *cpk28-1* etwa das Dreifache des Wildtypniveaus erreichte (Abb. 3-33B).

Weitere Proben zur Genexpression an Tag 31, *cpk28*-Insertions- und *CPK28*-Komplementationslinien beinhaltend (siehe Abb. 3-29), wurden ebenso auf Genregulation

JA-responsiver Gene, Genen der JA-Biosynthese und der JA-Signaltransduktion untersucht (Abb. 3-34).

Sowohl für die Expression JA-responsiver Gene (*PDF1.2* und *VSP2*) als auch für Gene in der Signaltransduktion (*JAZ1* und *JAZ10*) konnte abweichende Genregulation in *cpk28* festgestellt werden (Abb. 3-34A,C). Das zweite Allel *cpk28-2* bestätigte die schon beschriebene Transkriptakkumulation von *PDF1.2*, wobei in beiden Komplementationslinien (*35S::CPK28-YFP* und *pCPK28::CPK28-YFP*) mit der Reversion des *cpk28*-Phänotyps auch die Reversion der Genexpression zurück zum Wildtypniveau einherging. Für die Expression der Biosynthesegene *AOS* und *OPR3* konnte in den analysierten Proben keine signifikante Veränderung der Genregulation in *cpk28* detektiert werden (Abb. 3-34B).

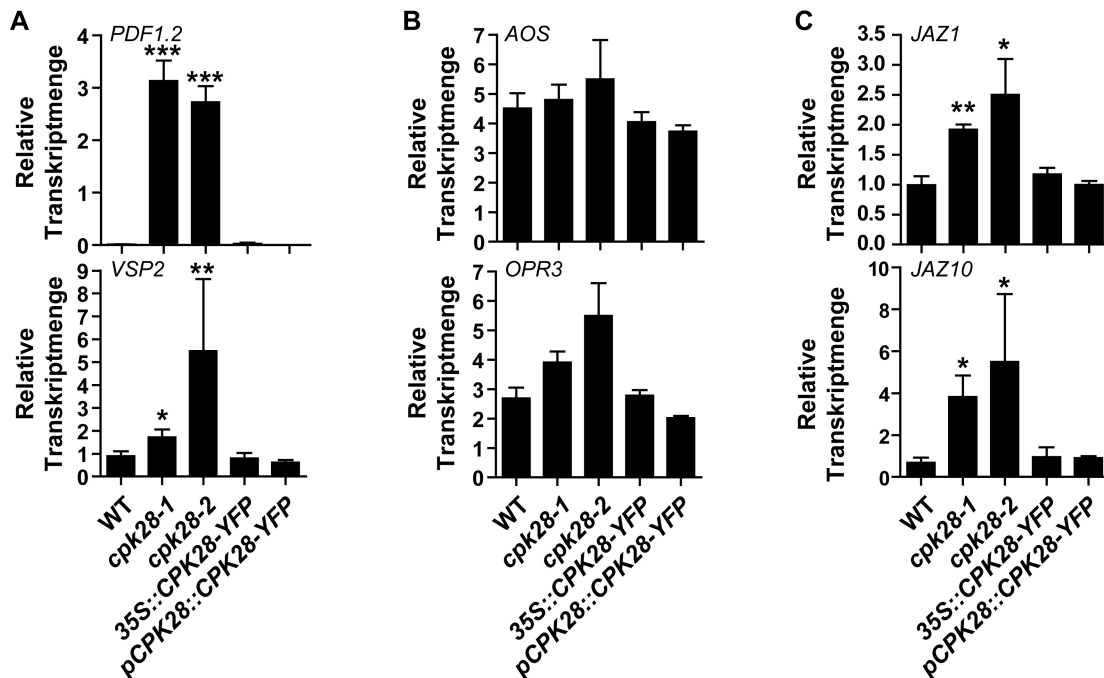


Abbildung 3-34: Genexpression von Markergenen in JA-Biosynthese und Signaltransduktion. Analyse der JA-responsiven Gene *PDF1.2* und *VSP2* (A), JA-Biosynthesegene *AOS* und *OPR3* (B) und JA-Signaltransduktionskomponenten *JAZ1* und *JAZ10* (C) in Wildtyp, *cpk28*-Insertionslinien und Komplementationslinien *35S::CPK28-YFP* und *pCPK28::CPK28-YFP* (31 Tage LD) mittels qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat) (t -test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$).

Jasmonat und Gibberellinsäure stellen im Wachstum der Pflanzen zwei Gegenspieler dar, deren Regulation je nach Umweltbedingungen der Pflanze entweder in die eine oder andere Richtung präferiert wird (Yang *et al.* 2012b). Da in dieser Arbeit in *cpk28* eine Deregulation des GA-Metabolismus festgestellt werden konnte, wurde nun analysiert, wie die *cpk28*-Mutanten in ihrem JA-abhängigen Expressionsprofil auf eine exogene Behandlung mit GA reagieren (Abb. 3-35).

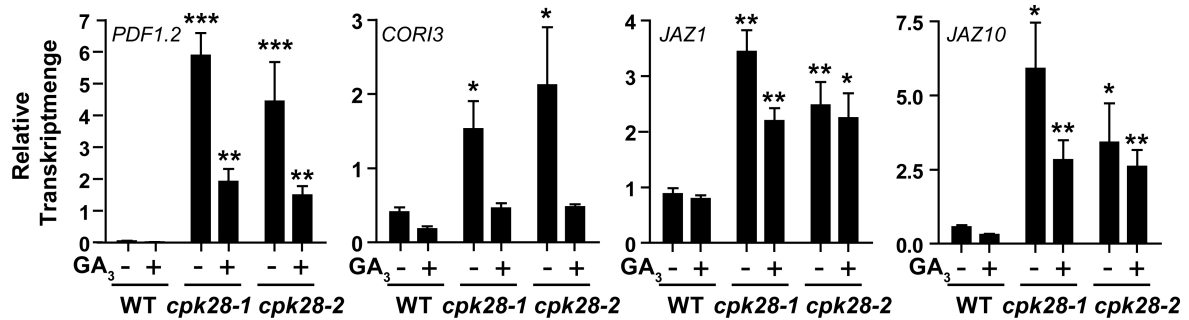


Abbildung 3-35: JA-abhängige Genexpression in Wildtyp und *cpk28* nach Behandlung mit Gibberellinsäure. Genexpressionslevel von *PDF1.2*, *COR13*, *JAZ1* und *JAZ10* in WT und *cpk28* nach Behandlung mit 100 μ M GA₃ (+) oder 0,95 % EtOH (-) (31 Tage LD). Werte repräsentieren den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat). (*t*-test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$; statistische Unterschiede werden für *cpk28* jeweils zum entsprechend gleichbehandelten Wildtyp gezeigt).

Sowohl die JA-responsiven Gene *PDF1.2* bzw. *COR13* als auch die Signaltransduktions-Komponenten *JAZ1* und *JAZ10* zeigten nach exogener Gibberellinbehandlung Reduktion der Genexpression in beiden *cpk28*-Allelen. Allerdings wurden im Vergleich zum entsprechend behandelten Wildtyp weiterhin erhöhte Transkriptlevel detektiert.

3.2.2.2. Genetische Interaktion von CPK28 und Mutanten des JA-Hormonhaushaltes

Zur Überprüfung des funktionalen Zusammenhangs zwischen CPK28 und dem JA-Haushalt wurden Kreuzungen von *cpk28* mit Mutanten in der JA-Biosynthese (*aos*, Linie SALK_017756) und der JA-Signaltransduktion (*coi1-16*, Ellis und Turner (2002)) durchgeführt und hinsichtlich der Ausbildung des *cpk28*-Phänotyps untersucht.

Eine vorläufige optische Analyse der Doppelmutanten direkt nach der Genotypisierung zeigte einen Einfluss der Funktionalität der JA-Biosynthese bzw. des JA-Signaltransduktionswegs auf die Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps (Abb. 3-36). In beiden *cpk28*-Allelen konnten mit dem Verlust der JA-Biosynthese *cpk28*-Charakteristika wie der reduzierte Rosettendurchmesser und deformierte Blätter revertiert werden (Abb. 3-36A). Auch die Sprosselongation war in den untersuchten Doppelmutanten wiederhergestellt (Abb. 3-36B). Phänotypische Unterschiede zum Wildtyp wie Sterilität der Doppelmutanten sind bekannte Merkmale der JA-abhängigen Mutanten (Ellis und Turner 2002, Park *et al.* 2002). Die gleiche phänotypische Ausprägung zeigte sich in einer Kreuzung von *cpk28-1* mit *coi1-16*, einer Mutante in der JA-Signaltransduktion (Ellis und Turner 2002), die Reversion des Phänotyps war also nicht nur auf Fehlen der Biosynthese beschränkt.

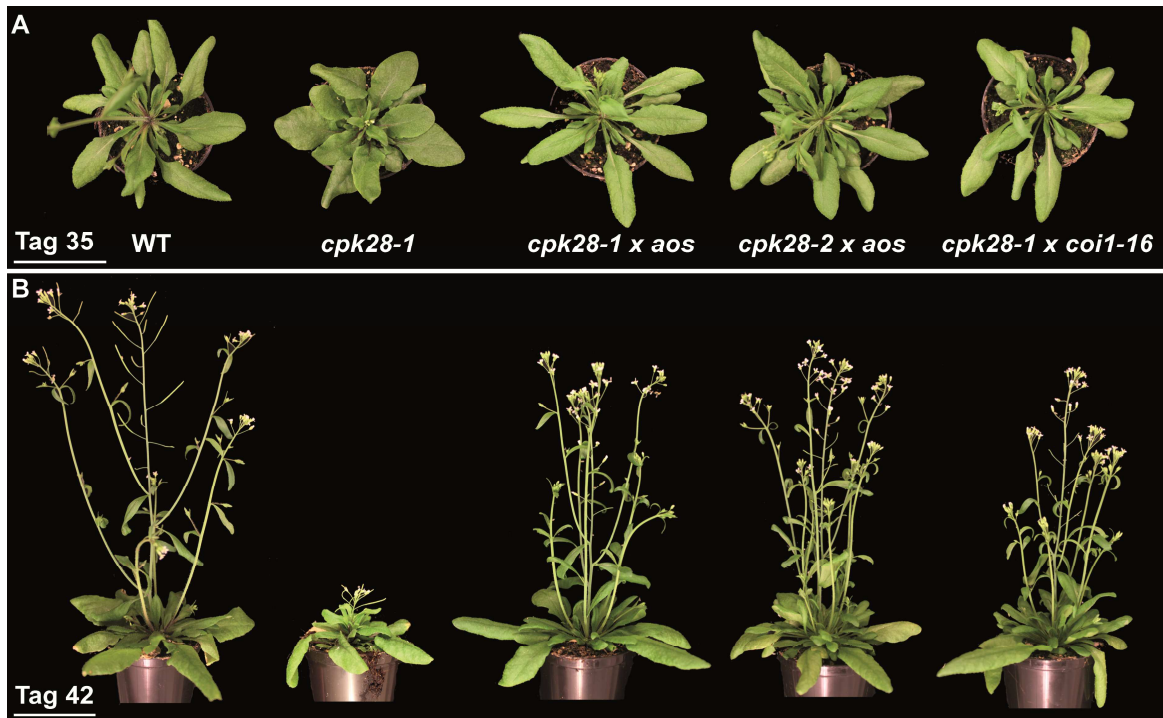


Abbildung 3-36: Reversion des *cpk28*-Sprosselongationsphänotyps durch Veränderungen im Jasmonathaushalt bzw. -signaltransduktion. Morphologie von Wildtyp, *cpk28-1*, *cpk28-1 x aos*, *cpk28-2 x aos*, *cpk28-1 x coi1-16* unter Langtagbedingungen (A) Rosettenansicht (Tag 35 LD), (B) Seitliche Ansicht (Tag 42 LD). Maßstab = 5 cm.

3.3. Biochemische Charakterisierung der CPK28

Einen weiteren Bestandteil dieser Arbeit stellt die biochemische Charakterisierung der Proteinaktivität der CPK28 dar. Neben der Untersuchung der Calcium-Abhängigkeit der Kinaseaktivität wurden auch potentiell regulatorische Phosphorylierungsstellen auf ihre Bedeutung für die Funktionalität der Kinase untersucht.

3.3.1. *In vitro*-Kinaseaktivität der CPK28

Für viele CPKs aus *Arabidopsis* wurde die Calcium-Abhängigkeit der Kinaseaktivität bereits analysiert (Übersicht in Boudsocq und Sheen (2013)). Dabei wurde unter den 34 *Arabidopsis*-Isoformen neben tatsächlich calcium-aktivierten Proteinkinasen auch eine Reihe designierter CPKs identifiziert, die bei Calcium-Gabe keine oder nur mäßige Aktivierung der Kinaseaktivität zeigen (Boudsocq *et al.* 2012). Für CPK28 waren vor dieser Arbeit keine Daten zur Kinaseaktivität veröffentlicht, weshalb Phosphorylierungsaktivität und potentielle Calciumabhängigkeit *in vitro* bestimmt wurden. Proteinexpression sowohl des Vollängenproteins CPK28 als auch der Varianten CPK28-VK, CPK28-D188A, CPK28-VK-D188A und CPK28-G2A erfolgte mit StrepII-Markierung im *N. benthamiana*-System und auch in *A. thaliana*-Protoplasten. Nach Aufreinigung mittels Affinitäts-

chromatographie erfolgte der *in vitro*-Kinaseassay mit immobilisiertem Protein und radioaktiv-markiertem ATP unter definierten Calcium-Konzentrationen. Für die Wildtyp-Version des Proteins wurden Zeit- und Calcium-Konzentrationsabhängigkeit sowie Substratspezifität mit verschiedenen synthetischen Peptiden bestimmt. Die Experimente zur Substratspezifität ausgenommen, wurde in Ermangelung des *in vivo*-Substrats das synthetische Peptid Syntide 2 als Phosphorylierungssubstrat verwendet, das seit langem als geeignetes *in vitro*-Substrat für CDPK-Analysen bekannt ist (Harmon *et al.* 1994, Harper *et al.* 1994).

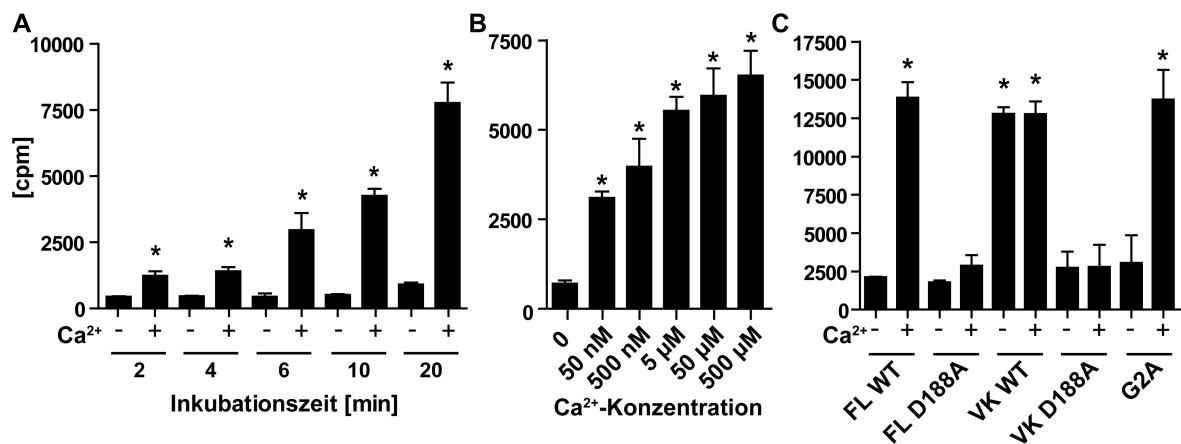


Abbildung 3-37: Calcium-abhängige *in vitro*-Kinaseaktivität von CPK28-Varianten. **A** Nach transienter Proteinexpression in *N. benthamiana* und Affinitätsaufreinigung streptII-markierter Proteine wurde die Zeitabhängigkeit der calcium-abhängigen *in vitro*-Phosphorylierungsaktivität der CPK28 mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, mit (+) und ohne (-) 5 μM Calcium und 10 μM Syntide 2 als Substrat bestimmt. Radioaktiv-markiertes Substrat wurde per Scintillationszählung detektiert. **B** *In vitro*-Kinaseaktivität in Abhängigkeit der Calcium-Konzentration. Definierte Calcium-Konzentrationen von 0 bis 500 μM wurden in calcium-chelatierten Reaktionsansätzen eingestellt und *in vitro*-Phosphorylierung von Syntide 2 nach 20 min Inkubation bei 30°C detektiert. **C** Kinaseaktivität des CPK28-Volllängen (FL WT)-Proteins, verkürzter (VK WT), deren inaktiver Varianten (FL-D188A, VK-D188A) und CPK28-G2A (G2A). Die Reaktionszeit betrug 20 Minuten bei 30°C mit (+) und ohne (-) 5 μM Calcium. Werte entsprechen dem Durchschnitt zweier technischer Replikate \pm Standardfehler. (*t*-test; signifikante Unterschiede gegenüber WT-Protein ohne Calcium * = $P < 0,05$). Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei (A und B) bzw. drei (C) unabhängigen Experimenten erzielt.

Die Kinaseaktivität des Wildtypproteins zeigte einen zeitabhängigen Verlauf, mit zunehmender Inkubationszeit erhöhte sich die Substratphosphorylierung (Abb. 3-37A). Ebenso konnte mit steigender Calcium-Konzentration im Reaktionsansatz eine Zunahme der Substratphosphorylierung erzielt werden (Abb. 3-37B). Niedrige Calcium-Konzentration (50 nM) führte nicht zu maximaler Aktivität des Enzyms, erst ab etwa 5 μM Calcium wurde vier- bis fünffache Aktivierung der CPK28-Aktivität beobachtet. Für das CPK28-Wildtypprotein (FL) wurde mit Syntide 2 als Substrat eine fünffache Steigerung der Phosphorylierungsaktivität bei Calcium-Gabe im Vergleich zu Kontrollbedingungen ohne Calcium beobachtet (Abb. 3-37C). Im Fall der mutierten Version CPK28-FL-D188A konnte keine signifikant gesteigerte Substratphosphorylierung bei Calcium-Anwesenheit nachgewiesen werden. CPK28-VK zeigte, wie schon die Proteinstruktur ohne

inhibitorische und calcium-bindende Domäne vermuten lässt, tatsächlich calcium-unabhängige Phosphorylierungsaktivität. Auch im Ansatz ohne Calcium konnte zum calcium-aktivierten Protein vergleichbare Substratphosphorylierung detektiert werden. Wie schon bei der Vollängenversion zeigte auch die CPK28-VK-D288A-Variante keine Aktivierung durch Calcium, wobei die messbare Aktivität mit und ohne Calcium nicht über den Hintergrundwert aller Proteinversionen ohne Calcium stieg. Die Veränderung der subzellulären Lokalisation durch Mutation der Myristoylierungsstelle (G2A) zeigte keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität des Enzyms, diese Proteinvariante zeigte wie das Wildtypenzym ca. fünffache Aktivitätssteigerung bei Calcium-Gabe.

3.3.2. Substratspezifität der CPK28

Die Substratspezifität von CPK28 wurde mit 10 μ M Syntide 2 als kommerziell erhältlichem Peptid und weiteren im Labor verfügbaren Standardpeptiden durchgeführt. Diese Peptide waren entsprechend der Proteinsequenz in der Literatur diskutierter, potentieller CPK-Substrate ausgewählt und synthetisiert worden, und enthalten putative CPK-Phosphorylierungsstellen: ACA2 (RFTANLSKRYEAA), ACS6 (QSNLRLSFS DTRRF) und zwei unterschiedliche Peptide der NADPH-Oxidase *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D* (RBOHD), RBOHD-1 (FFRSTSSRIKNA) und RBOHD-2 (LRRVFSRPRSK).

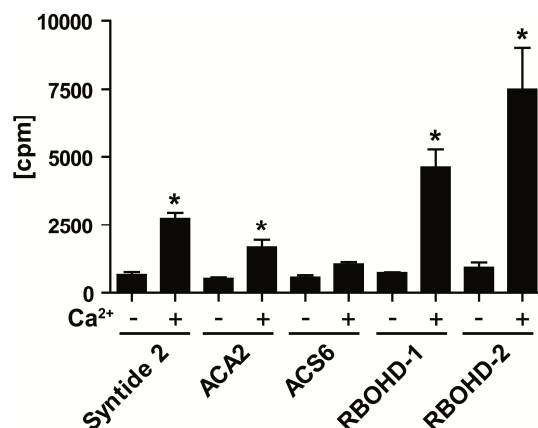


Abbildung 3-38: *In vitro*-Substratspezifität der CPK28. *In vitro*-Kinaseaktivität mit [γ -³²P]-ATP und synthetischen Peptiden Syntide 2, ACA2 (RFTANLSKRYEAA), AtACS6 (QSNLRLSFS DTRRF), RBOHD-1 (FFRSTSSRIKNA) und RBOHD-2 (LRRVFSRPRSK) als Substrat. Die Reaktionszeit betrug 20 Minuten bei 30°C mit (+) und ohne (-) 5 μ M Calcium. Radioaktiv markiertes Substrat wurde per Scintillationszählung detektiert. Werte entsprechen dem Durchschnitt zweier technischer Replikate \pm Standardfehler. (*t*-test; signifikante Unterschiede * = *P* < 0,05). Ähnliche Ergebnisse wurden für zwei unabhängige Experimente erzielt.

Bis auf das ACS6-Peptid konnten alle untersuchten Peptide als *in vitro*-Substrat der CPK28 dienen (Abb. 3-38). Hierbei wurde mit Syntide 2 als Substrat die unter 3.3.1. beschriebene vier- bis fünffache Aktivitätszunahme bestätigt. Das ACA2-Peptid wurde in Anwesenheit von Calcium in geringerem Maße phosphoryliert, die Steigerung der Kinaseaktivität bei Calcium-Gabe betrug in diesem Fall nur das Zwei- bis Dreifache. Beide Peptide der RBOHD, die als *in vivo*-Substrat der CPK5 diskutiert wird (unveröffentlichte Daten, AG Romeis), stellen in diesem Experiment die besten Substrate auch für CPK28 dar, in Anwesenheit von Calcium erfolgte ein etwa sechsfacher (RBOHD-1) bzw. achtfacher (RBOHD-2) Anstieg der Phosphorylierungsaktivität.

3.3.3. Analyse der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495 von CPK28

Bisherige CDPK-Analysen legten sowohl *in vivo*-Auto- als auch Trans-Phosphorylierung durch vorgeschaltete Kinasen offen, wobei stimulus-abhängige und auch konstitutive Phosphorylierungsstellen identifiziert werden konnten (Witte *et al.* 2010). In einer umfassenden massenspektrometrischen Analyse rekombinanter, *E. coli*-synthetisierter *Arabidopsis*-CPKs konnten drei *in vitro*-Auto-Phosphorylierungsstellen für CPK28 identifiziert werden, nämlich jeweils ein Serin an Position S228 bzw. S318 innerhalb der Kinase-Domäne und Serin S495 in der C-terminalen calmodulin-ähnlichen Region (Abb. 3-39A) (Hegeman *et al.* 2006). Diese Phosphorylierungsstellen wurden im Zuge dieser Arbeit auf ihre Bedeutung für die CPK28-Funktionalität untersucht.

3.3.3.1. *In vivo*-Identifikation per Massenspektrometrie

In einem ersten Schritt wurde die *in planta*-Phosphorylierung der drei Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495 untersucht. Hierzu wurden strepII-markiertes CPK28-Protein und die inaktive Variante CPK28-D188A transient in *Arabidopsis*-Mesophyllzellprotoplasten exprimiert, welche aus *cpk28-1* isoliert waren um mögliche Phosphorylierungsereignisse durch endogen vorhandenes CPK28-Protein auszuschließen. Nach Affinitätsreinigung und Trypsinverdau erfolgte eine massenspektrometrische Analyse der Phospho-Peptide in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Waltraud Schulze am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm. Hier wurde speziell nach den jeweiligen unphosphorylierten und phosphorylierten Peptidvarianten gesucht.

Im Vergleich zur inaktiven Kinase wurden im Falle der aktiven CPK28 Phospho-Peptide für S318 (LTAAQALp**S**HAWVR) und S495 (lp**S**LHEFR) mit einer ca. 25-fachen (S318) beziehungsweise 110-fachen (S495) Anreicherung gemessen. Dies lässt auf eine tatsächliche *in vivo*-Auto-Phosphorylierung dieser beiden Serinreste schließen (Abb. 3-39B). Phosphoryliertes S228-Peptid (FHDIVGp**S**AYYVAEPVLK) wies bei Analyse des aktiven Proteins mit einer vierfachen Erhöhung im Vergleich zur inaktiven Kinase geringere Phosphorylierung als die anderen untersuchten Peptide auf.

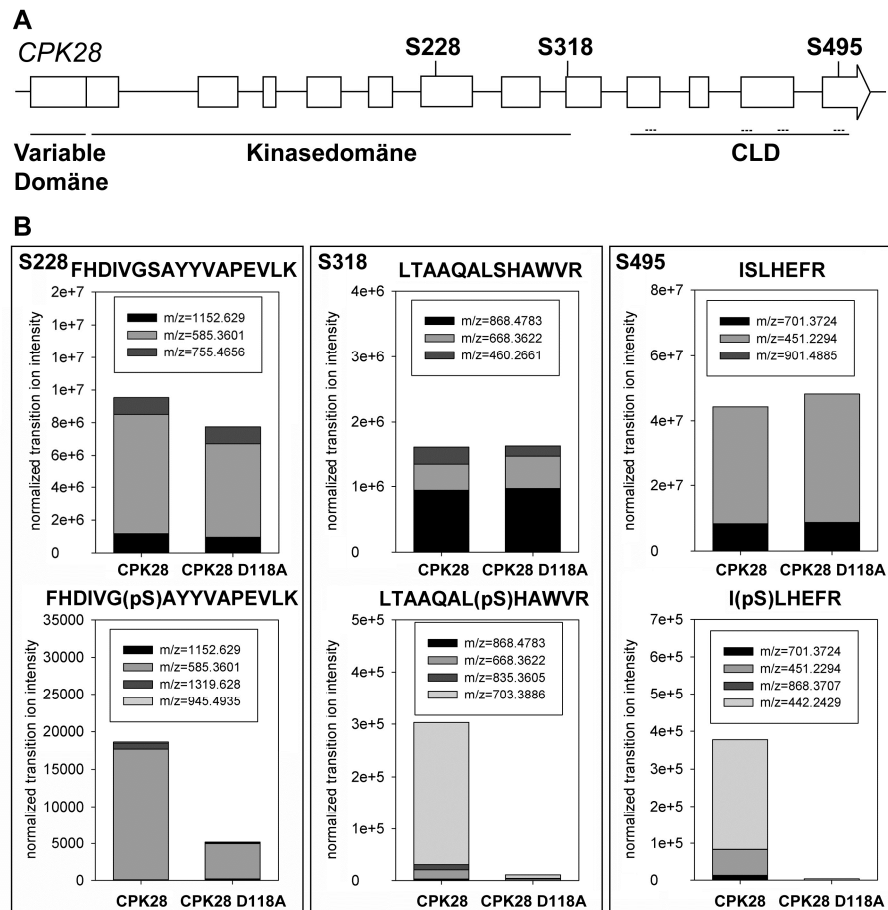


Abbildung 3-39: *In vivo*-Phosphorylierungsstellen von CPK28. **A** Schematische Darstellung der Position der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495 in der *CPK28*-Gen- und Proteinstruktur. **B** CPK28-Wildtyp-Protein (CPK28) und kinase-inaktive Variante (CPK28 D118A) wurden 16 Stunden transient in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellprotoplasten (aus *cpk28-1*-Pflanzen) exprimiert. Nach Affinitätsaufreinigung mittels Strep-Markierung und Trypsinverdau wurden die Phosphorylierungsstellen per Massenspektrometrie (MS) analysiert. Normalisierte Ionenintensitäten für (Phospho-)Peptide S228, S318 und S495 sind für die jeweiligen Peptide als Summen der Intensitäten der stärksten Ionenfragmente dargestellt. Normalisierung erfolgte gegen die Gesamtsumme der Intensitäten pro Probe. (pS) = phosphoryliertes Serin.

3.3.3.2. *In vitro*-Funktionalität der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495

Die Bedeutung der identifizierten Phosphorylierungsstellen für die Funktionalität des CPK28-Proteins wurde zunächst in *in vitro*-Kinaseexperimenten untersucht. Für jede Phosphorylierungsstelle wurden verschiedene Punktmutationen mittels zielgerichteter Punktmutagenese in die codierende Sequenz der CPK28 eingeführt, die entweder einen Aminosäureaustausch zu nicht phosphorylierbaren Alanin (S=>A) (Phosphorylierungsverlust) oder zu einem eine konstitutive Phosphorylierung simulierenden Aspartat (S=>D) (Phosphorylierungsimitation) bewirkten. Die Phospho-Varianten wurden als strepII-markierte Proteine transient in *N. benthamiana* exprimiert, aufgereinigt und im *in vitro*-Kinaseassay analysiert (Abb. 3-40).

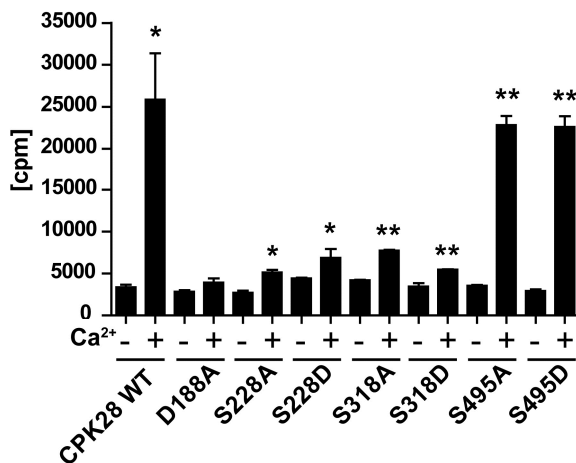


Abbildung 3-40: Calcium-abhängige Kinaseaktivität der CPK28-Phosphorylierungsvarianten. *In vitro*-Kinaseaktivität von CPK28-Wildtyp-Protein, kinase-inaktiver Version D188A und Phosphorylierungs-Varianten S228A, S228D, S318A, S318D, S495A und S495D. Nach transienter Proteinexpression in *N. benthamiana* und Affinitätsaufreinigung streptII-markierter Proteine wurde die *in vitro*-Kinaseaktivität mit [γ -³²P]-ATP und 10 μ M Syntide 2 als Substrat bestimmt (Reaktionszeit 20 Minuten bei 30°C mit (+) und ohne (-) 5 μ M Calcium). Radioaktiv markiertes Substrat wurde per Scintillationszählung detektiert. Werte entsprechen dem Durchschnitt zweier technischer Replikate \pm Standardfehler. (*t*-test für unabhängige Stichproben, signifikante Unterschiede bezogen auf Kinaseaktivität des WT-Proteins ohne Calcium * = $P < 0,05$ und ** = $P < 0,01$). Ähnliche Ergebnisse wurden für drei unabhängige Experimente erzielt.

Wie bereits beschrieben wies Wildtyp-CPK28 in Anwesenheit von Calcium eine ca. fünfmal erhöhte Phosphorylierungsaktivität auf, während die CPK28-D188A-Variante keine calcium-induzierte Aktivitätssteigerung zeigte. Interessanterweise konnte für beide in der Kinasedomäne liegenden Phosphorylierungsstellen S228 und S318 ein Einfluss auf die *in vitro*-Kinaseaktivität gezeigt werden. Hierbei wurde sowohl für den Verlust als auch die Imitation einer konstanten Phosphorylierung eine geringere Aktivität als im Wildtyp-Protein beobachtet, die etwa einer Verdopplung der Aktivität durch Calcium-Gabe entsprach. Im Fall der Manipulation von S495 in der calcium-bindenden Domäne der CPK28 konnte keine Veränderung der Aktivität durch den Aminosäureaustausch S \rightarrow A oder auch S \rightarrow D nachgewiesen werden, diese Proteinvarianten zeigten fünfmalige Steigerung der Aktivität nach Calcium-Gabe wie das Wildtypprotein.

3.3.3.3. Phänotypische Komplementationsanalyse der CPK28-Phosphorylierungsvarianten

Neben der Funktionalität der Phosphorylierungsstellen *in vitro* wurde auch deren Rolle für die Funktion der CPK28 *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurden sämtliche beschriebenen CPK28-Phospho-Varianten als YFP-markierte Konstrukte in die *cpk28-1*-Mutante eingebracht, um die Komplementationsfähigkeit dieser Proteinvarianten zu überprüfen. Mindestens zwei unabhängige transgene Linien pro Konstrukt wurden auf Proteinexpression überprüft und hinsichtlich der Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps analysiert.



Abbildung 3-41: *In vivo*-Komplementation der CPK28-Phosphorylierungsvarianten. Transgene *cpk28-1*-Pflanzen, die Proteinvarianten der mutierten Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495 unter einem konstitutiv-aktiven Promotor (*35S::CPK28-S228A-YFP*, *35S::CPK28-S228D-YFP*, *35S::CPK28-S318A-YFP*, *35S::CPK28-S318D-YFP*, *35S::CPK28-S495A-YFP* und *35S::CPK28-S495D-YFP*) exprimieren, wurden auf Komplementation des *cpk28*-Phänotyps untersucht. Repräsentative Komplementation für mindestens zwei unabhängige Linien pro Konstrukt. Maßstab = 5 cm.

Die Komplementationsanalyse zeigte ein anderes Bild als die *in vitro*-Analyse der Phosphorylierungsstellen vermuten ließ (Abb. 3-41). Jede der untersuchten Phospho-Varianten (S228A bzw. S228D, S318A bzw. S318D und S495A bzw. S495D) war in der Lage, den *cpk28*-Phänotyp zu revertieren und die Sprosselongation wiederherzustellen. Selbst die Phosphorylierungsvarianten mit verminderter *in vitro*-Aktivität (alle S228- und S318-Konstrukte, siehe Abb. 3-40) zeigten dem Wildtyp ähnliche Pflanzenmorphologie.

3.4. Interaktionsanalysen mit CPK28

Eine essentielle Information für die Aufklärung der zellulären Funktion von Kinasen ist die Frage nach dem tatsächlichen *in vivo*-Substrat. Zur Identifikation eines solchen wurde eine Proteininteraktionsanalyse der CPK28 im heterologen Hefe-2-Hybridensystem (Y2H) in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Uhrig (Universität Köln) unternommen. Hierzu wurde die codierende Sequenz der CPK28 in einen Hefe-2-Hybridvektor kloniert und Interaktion der CPK28 mit Proteinen aus zwei unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana*-cDNA-Banken untersucht. Dr. Uhrig konnte insgesamt vier potentielle Interaktoren isolieren, deren Sequenz inklusive farbiger Kennzeichnung der im Hefe-System interagierenden Sequenz im Anhang als Abbildung 6-2 zu finden ist.

Folgende putative Interaktionspartner wurden isoliert:

- eine *Protein Phosphatase 2C* (nachfolgend PP2C genannt) (AT1G67820)
- der *Calcium Sensing Receptor* (CaS) (AT5G23060)
- ein *Cystatin/Monellin Superfamily Protein* (Cys) (AT4G16500)
- ein Protein aus der Ferritin/Ribonukleotid-Reduktase-ähnlichen Familie mit Ähnlichkeit zu einer Glykosylhydrolase (AT3G61010)

Die identifizierte *Protein Phosphatase 2C* stammt aus der Untergruppe B der PP2C-Phosphatasen, einer Proteinfamilie mit 78 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana*, die in 13 Untergruppen (A-K) gegliedert ist (Xue *et al.* 2008). Mitglieder der Gruppe B sind durch ihre Sequenzhomologie zur Phosphatase MP2C aus *Medicago sativa* charakterisiert, einer PP2C, die mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Signaltransduktion reguliert (Schweighofer *et al.* 2004). Expressionsdaten der identifizierten, auch als AP2C4 bezeichneten, Phosphatase in öffentlichen Datenbanken zeigen nur schwache Expression während des Entwicklungszyklus der Pflanze mit Maxima in Samen und dem entwickelnden Embryo (eFP-Browser (Winter *et al.* 2007)). In einer genomweiten Analyse sämtlicher PP2Cs aus *Arabidopsis* und Reis konnte AP2C4-Transkript ebenso nur in der Infloreszenz und in der Schote festgestellt werden (Xue *et al.* 2008). Eine Funktion der PP2C im MAPK-Signalweg wurde aufgrund PP2C-vermittelter *in vitro*-Dephosphorylierung der MAP-Kinase MPK6 postuliert (Umbrasaite *et al.* 2010). In dieser Arbeit wurde auch *in vivo*-Interaktion der PP2C mit MPK3 und MPK6 mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Arabidopsis*-Protoplasten gezeigt, PP2C-GFP-Fusionsprotein wurde im Kern lokalisiert, und für T-DNA-Insertionsmutanten und auch Überexpressionslinien der PP2C wurde kein Phänotyp festgestellt (Umbrasaite *et al.* 2010).

Als zweiter putativer Interaktor der CPK28 wurde der *Calcium Sensing Receptor* (CaS) (AT5G23060) identifiziert, der in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert ist und sich für die calcium-induzierte Schließzellenregulation verantwortlich zeigt (Weinl *et al.* 2008). CaS kann Calcium binden (Han *et al.* 2003) und bewirkt, über einen Wasserstoffperoxid-(H₂O₂) und Stickstoffmonoxid-(NO)-vermittelten Signalweg (Wang *et al.* 2012), cytosolischen Calcium-Anstieg in Folge der Erhöhung extrazellulären Calciums (Weinl *et al.* 2008). Neben der Schließzellenregulation wird CaS auch eine Rolle in der Pflanzenentwicklung zugewiesen. Linien mit verminderter CaS-Expression zeigten einen „*bolting*“-Phänotyp unter calcium-defizienten Wachstumsbedingungen, wobei nicht genau definiert wurde, ob nur die Elongation der Internodien oder die Blühinduktion an sich betroffen war. „*Bolting*“ der CaS-defizienten Pflanzen fand unter calcium-reduzierten Bedingungen später als im Wildtyp statt, außerdem konnten die Pflanzen nicht blühen (Han *et al.* 2003). Kürzlich wurde auch eine Funktion von CaS in der Regulation der durch pathogen-assoziierte molekulare Muster-(PAMP)-induzierten basalen Resistenz in Pflanzen und des hypersensitiven Zelltods beschrieben (Nomura *et al.* 2012).

Weiterhin wurde ein putativer Proteaseinhibitor aus der *Cystatin/Monellin Superfamily* (Cys) (AT4G16500) als Interaktor für CPK28 ermittelt. Für dieses Protein gibt es nur wenige weiterführende Informationen. Einerseits wurde es als vakuoläres Protein mit einer Rolle in der pflanzlichen Stressantwort identifiziert (Carter *et al.* 2004). In mehreren massenspektrometrischen Analysen wurde Cys andererseits als Zellwandprotein aus

Zellwandfraktionen isoliert (Boudart *et al.* 2005, Irshad *et al.* 2008). *In silico*-Daten des eFP-Browsers geben eine relativ gleichmäßige Expression während der gesamten Pflanzenentwicklung mit Maxima in Schote und Embryo an.

Als letzter potentieller Interaktor für CPK28 konnte ein nicht weiter charakterisiertes, putatives Protein aus der Familie der Ferritin/Ribonukleotid-Reduktase-ähnlichen Proteine mit Ähnlichkeit zu Glykosylhydrolasen identifiziert werden (AT3G61010). Leider konnte dieses Gen in wiederholten Versuchen sowohl auf cDNA- als auch genomischer Ebene nicht amplifiziert werden, weshalb im Rahmen dieser Arbeit nur drei der vier angegebenen Interaktoren weiteren Analysen unterzogen wurden und hier beschrieben werden. Diese Experimente wurden größtenteils zusammen mit der Bachelorstudentin Katharina Hake durchgeführt, der großer Dank für ihre sorgfältige Arbeit in diesem Teilprojekt gebührt.

3.4.1. Lokalisation der putativen Interaktionspartner

Die subzelluläre Lokalisation der potentiellen Interaktionspartner ist ein Aspekt, um die Möglichkeit der Interaktion *in vivo* durch räumliche Nähe innerhalb der Zelle zu überprüfen. Deshalb wurde die Lokalisation der potentiellen Interaktoren per YFP-Markierung im heterologen *N. benthamiana*-Expressionssystem am konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 3-42).

Für die PP2C konnte vorwiegend Expression im Nucleus festgestellt werden, wobei ein kleiner Anteil des Gesamtproteins auch im Cytosol nachgewiesen wurde (Abb. 3-42A). Wie bereits in der Literatur beschrieben (Weinl *et al.* 2008) konnte CaS ausschließlich in den Chloroplasten beobachtet werden, was damit ebenso der zuvor publizierten cytosolischen Lokalisation widersprach (Han *et al.* 2003) (Abb. 3-42B). Der dritte Interaktionspartner Cys wurde im Cytosol lokalisiert, klar anhand der Fluoreszenz von cytoplasmatischen Strängen erkennbar (Abb. 3-42C). Dieses Protein wurde ausschließlich im Cytosol detektiert, zusätzliche Kernlokalisation wie bei anderen cytosolischen Proteinen wurde nicht beobachtet.

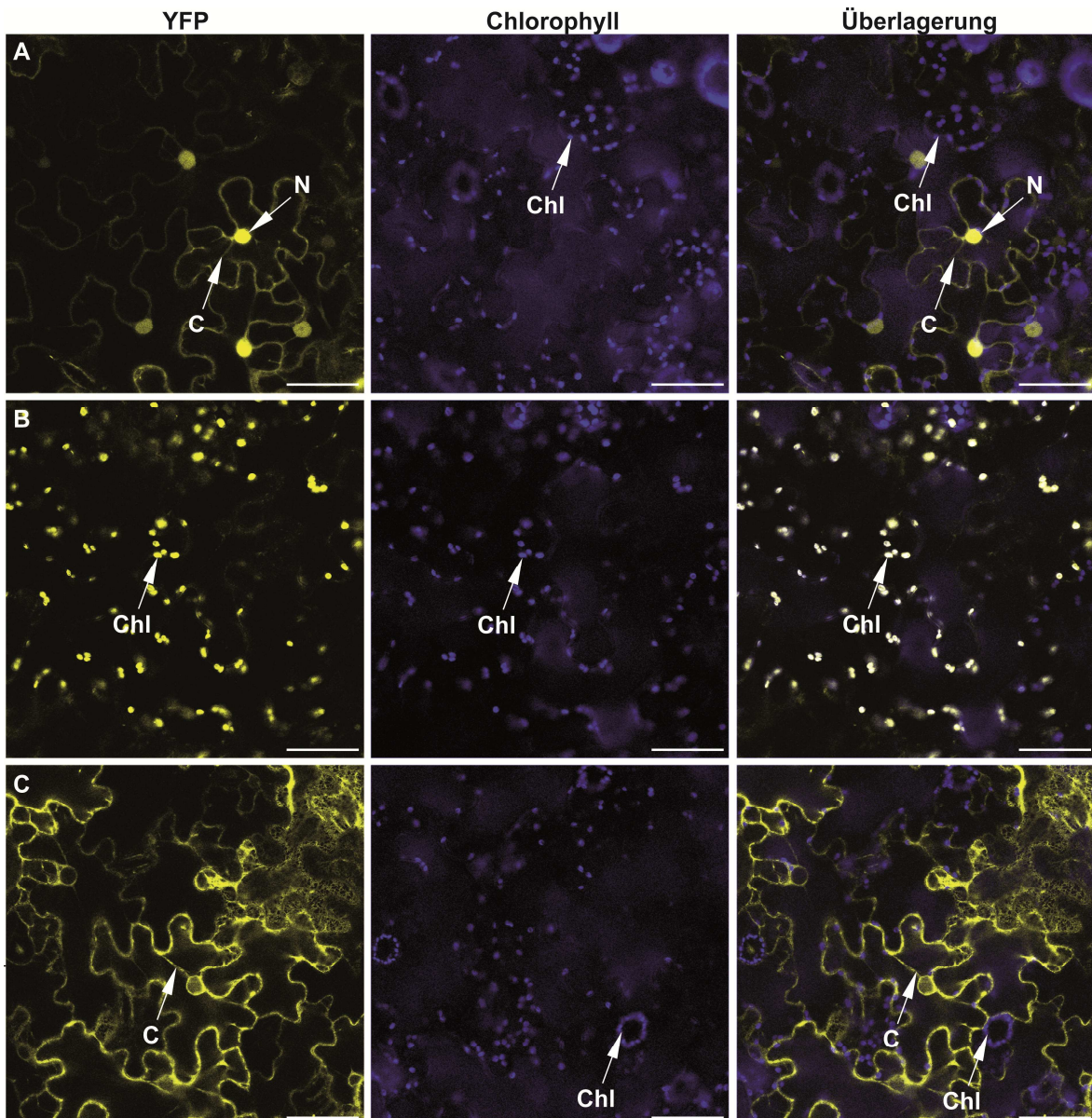


Abbildung 3-42: Subzelluläre Lokalisation der putativen Interaktionspartner der CPK28. Transiente Expression von PP2C-YFP (A), CaS-YFP (B) und Cys-YFP (C) in *N. benthamiana*. Als Lokalisationsmarker wurde die Chloroplasten-Eigenfluoreszenz (Chl) herangezogen. N = Nucleus, C = Cytoplasma. Maßstab = 50 µm.

3.4.2. Interaktionsanalyse durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Eine weitere Charakterisierung der Proteininteraktion mit CPK28 beinhaltete die Untersuchung der *in vivo*-Interaktion mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (Waadt *et al.* 2008). In diesem Experiment werden die möglichen Interaktionspartner jeweils mit der C-(YCE)- oder N-(YNE)-terminalen Hälfte der YFP-codierenden Sequenz verbunden. Nach transienter Expression beider Fusionsproteine in *N. benthamiana* kann nur im Fall einer Proteininteraktion Fluoreszenz detektiert werden, wenn aufgrund der räumlichen Nähe der interagierenden Proteine eine Zusammenlagerung der beiden YFP-Hälften stattfindet und somit die Fluoreszenz wiederhergestellt ist.

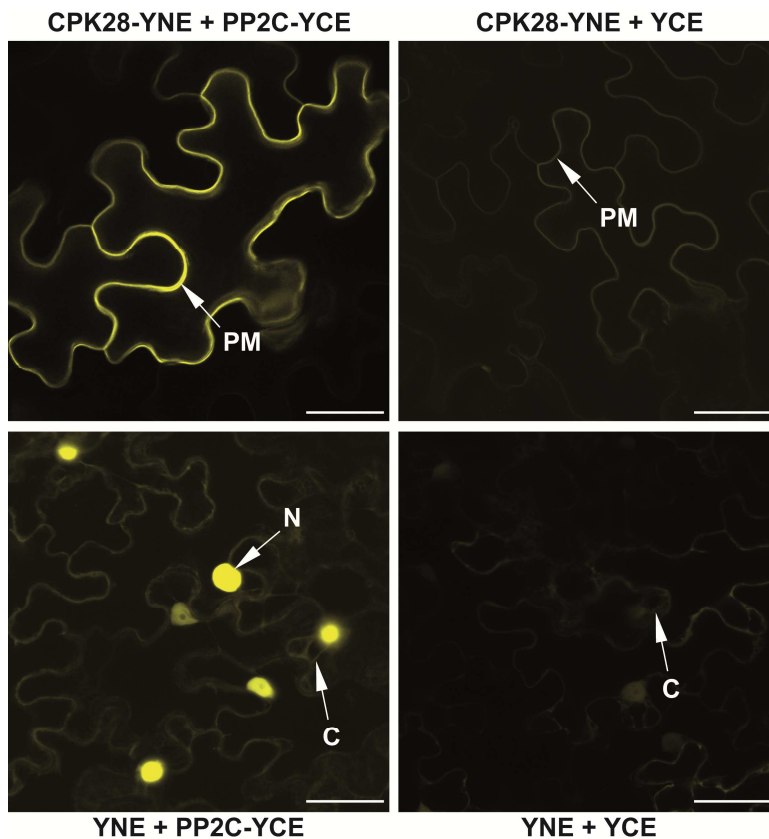


Abbildung 3-43: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von CPK28 und PP2C. YFP-Fragment-Fusionsproteine von CPK28 (CPK28-YNE), PP2C (PP2C-YCE) und entsprechende Kontrollen (YNE bzw. YCE) wurden für drei Tage in *N. benthamiana* koexprimiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. PM = Plasmamembran, N = Nucleus, C = Cytosol. Maßstab = 50 μm .

Hier dargestellt ist die Interaktionsanalyse zwischen CPK28 und PP2C mit den entsprechenden Kontrollen (Abb. 3-43). Im Fall der Koexpression von CPK28-YNE und PP2C-YCE konnte eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz gegenüber den Kontrollbedingungen beobachtet werden. Expression der beiden YFP-Hälften alleine oder CPK28-YNE mit YCE zeigte ein kaum detektierbares Fluoreszenzsignal. Bei Expression von PP2C-YCE mit dem Kontroll-Protein YCE erfolgte eine starke Fluoreszenzdetektion im Kern, ähnlich der Proteinlokalisierung mit einer vollständigen YFP-Markierung (siehe Abb. 3-42). Interessanterweise verschwand diese Kernlokalisierung vollständig bei Koexpression von CPK28-YNE, in diesem Fall konnte die Fluoreszenz ausschließlich an der Plasmamembran beobachtet werden.

Die beiden anderen potentiellen Interaktoren CaS und Cys zeigten keine Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu Kontrollen nach Koexpression in Tabak, weshalb auf eine Darstellung des Ergebnisses in Bildern verzichtet wird. Die weiteren Interaktionsanalysen beschränkten sich aufgrund der wenig überzeugenden Ergebnisse der Analysen der anderen Kandidaten nachfolgend auf die Untersuchung der PP2C-CPK28-Interaktion.

3.4.3. *In vitro*-Interaktionstest

Die weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen CPK28 und PP2C erfolgte mit einer *in vitro*-Interaktionsanalyse durch Glutathion-S-Transferase-(GST)-*pull-down*-Experimente. Hierzu wurde die codierende Sequenz der Phosphatase mit einer GST-

Markierung versehen und rekombinant in *E. coli* synthetisiert. Nach Aufreinigung des Proteins über eine Glutathion-Agarose-Matrix wurde die immobilisierte Phosphatase mit Pflanzenextrakten aus CPK28-YFP- oder CPK32-YFP-überexprimierenden *N. benthamiana*-Pflanzen inkubiert und nach mehreren Waschschritten mit Glutathion eluiert. Die eluierte Phosphatase wurde mit einem SDS-Gel und Coomassie-Färbung, interagierendes YFP-Protein mit einem Western Blot mit anti-GFP nachgewiesen.

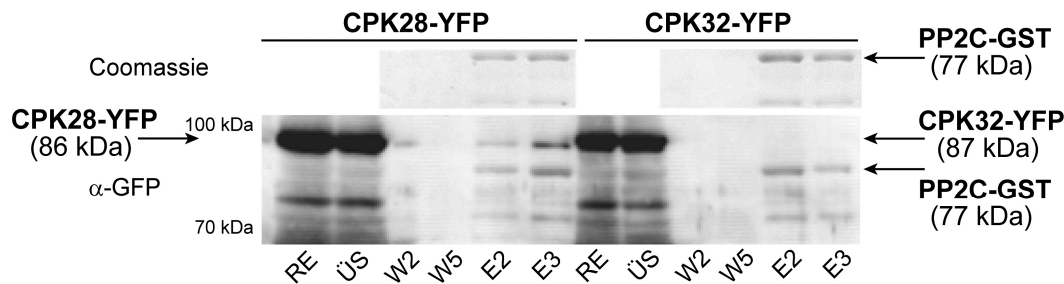


Abbildung 3-44: *In vitro*-Interaktionsanalyse von CPK28 und PP2C. PP2C-GST wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels Glutathionagarose aufgereinigt. Nach Inkubation mit unterschiedlichen CPK-YFP-Isoformen exprimierenden Rohextrakten aus *N. benthamiana* und fünf Waschschritten erfolgte die Elution (dreimal) der gebundenen Proteine mit Glutathion. Nachweis der Proteine erfolgte mittels SDS-Gel und anschließender Coomassie-Färbung (GST-Proteine) oder Western Blot (YFP-Nachweis mit α -GFP). RE = *N. benthamiana*-Rohextrakt, ÜS = Überstand des *N. benthamiana*-Extrakts nach Inkubation mit PP2C-GST, W2 = Waschschrift #2, W5 = Waschschrift #5, E2 = Eluat #2, E3 = Eluat #3.

Das *pulldown*-Experiment konnte eine Interaktion von CPK28 und der untersuchten Phosphatase bestätigen (Abb. 3-44). Nach Inkubation mit unterschiedlichen CPK-YFP-Proteinen und mehreren Waschschritten konnte nur im Fall der CPK28 spezifisches YFP-Protein in den Eluatfraktionen 2 und 3 nachgewiesen werden. Das als Kontrolle verwendete CPK32-YFP-Fusionsprotein war nach Elution der Phosphatase nicht mehr zu detektieren. Dies deutet auf eine spezifische Interaktion der CPK28 mit der PP2C hin.

Weitere biochemische Studien zum Zusammenhang zwischen CPK28 und der PP2C waren leider nicht erfolgreich. So konnte in wenigen Testexperimenten weder *in vitro*-Phosphorylierung von aufgereinigtem PP2C-GST-Protein durch CPK28 gezeigt werden noch *in vitro*-Dephosphorylierung der CPK28 durch die Phosphatase (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden Funktionsverlust- bzw. -gewinnmutanten der PP2C untersucht, um vielleicht einen funktionalen Zusammenhang der Proteine *in vivo* herzustellen.

3.4.4. Charakterisierung von *pp2c*-T-DNA-Insertionslinien bzw. PP2C-Überexpressionslinien

pp2c-T-DNA-Insertionslinien (*pp2c*) und PP2C-Überexpressionslinien (*35S::PP2C-YFP*) wurden zur Überprüfung des potentiellen Zusammenhangs mit CPK28 untersucht. Dazu wurde eine bereits beschriebene T-DNA-Insertionslinie SALK_000296 (Umbrasaite *et al.* 2010) von NASC bezogen und transgene Linien im Col-0 Hintergrund hergestellt, die

PP2C-YFP unter dem 35S-Promotor exprimierten. Diese Linien wurden phänotypisch und auf Genexpressionsebene charakterisiert, um einen möglichen funktionalen Zusammenhang mit der CPK28 oder dem *cpk28*-Phänotyp zu analysieren.

3.4.4.1. Phänotypische Beschreibung von *pp2c* und *35S::PP2C-YFP*

Die phänotypische Charakterisierung *pp2c* und *35S::PP2C-YFP* erfolgte unter Langtagbedingungen (Abb. 3-45).



Abbildung 3-45: Phänotyp der *pp2c*-T-DNA-Insertionslinien bzw. *PP2C*-Überexpressionslinien: Morphologie von Wildtyp, *35S::PP2C-YFP* (4 Linien #8, #9, #11 und #12) und *pp2c* unter Langtagbedingungen. **A** Rosettenansicht (Tag 34 LD), **B** Seitliche Ansicht (Tag 48 LD). Maßstab = 5 cm.

Rein optisch konnte im Fall der T-DNA-Insertionslinie *pp2c* keinerlei Abweichung von der Wildtypmorphologie festgestellt werden, die Pflanzen zeigten normale Sprosselongation und gleiches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Die *PP2C*-Überexpressionslinien dagegen zeigten eine extrem verringerte Wachstumsgeschwindigkeit, die Pflanzen blieben während aller Entwicklungsphasen kleiner und entwickelten sich langsamer als der Wildtyp (Abb. 3-45A,B). Eine dem *cpk28*-Phänotyp ähnliche Wachstumsderegulation mit reduzierter Sprosselongation und stadienspezifischer Phänotyp-Entwicklung konnte dagegen nicht festgestellt werden.

Bei der Untersuchung zur Lokalisation des *PP2C-YFP*-Proteins in den transgenen Linien wurde eine interessante Beobachtung zur Zellstruktur der Epidermis gemacht (Abb. 3-46).

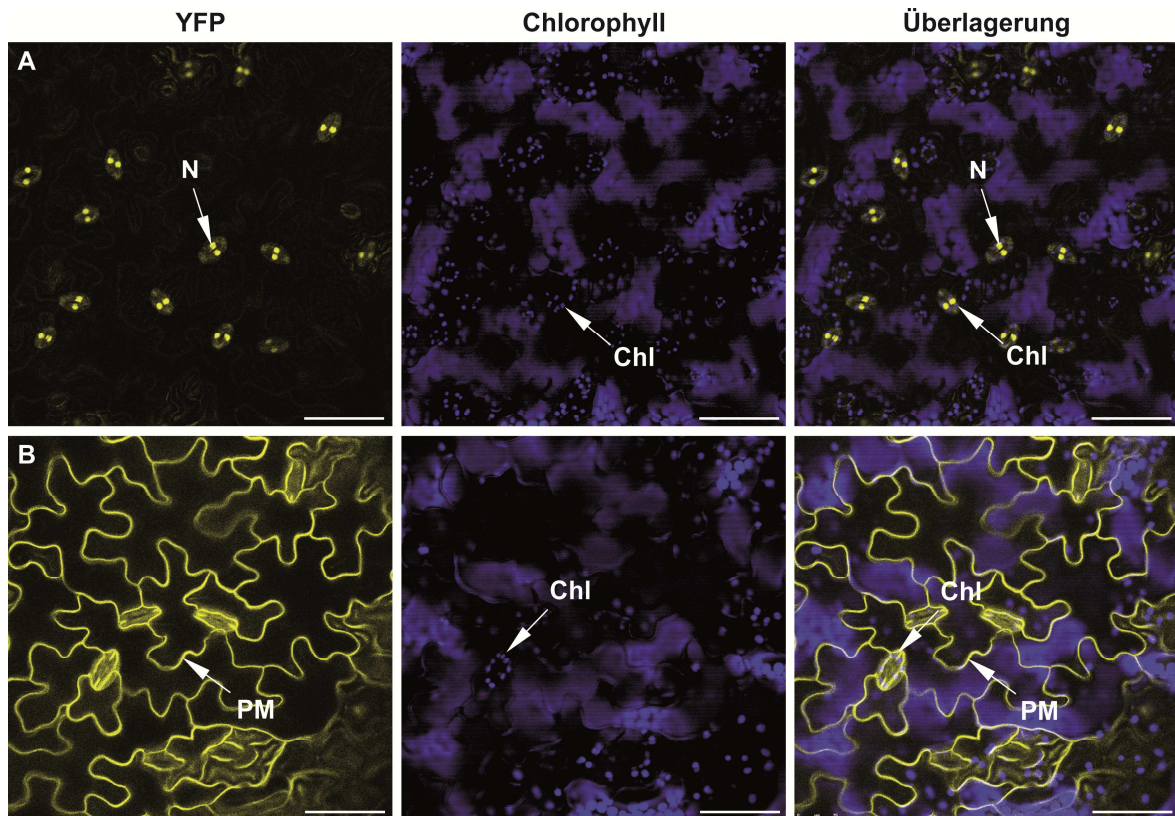


Abbildung 3-46: Subzelluläre Lokalisation der transgenen Proteine in *35S::PP2C-YFP* und *35S::CPK28-YFP*. Ausgewachsene Rosettenblätter adulter Pflanzen der stabilen transgenen Linien *35S::PP2C-YFP* (A) und *35S::CPK28-YFP* (B) wurden am konfokalen Mikroskop untersucht. PM = Plasmamembran, Chl = Chloroplast, N = Nucleus. Maßstab 50 µm.

Wie schon in Lokalisationsexperimenten bei Expression in Tabak (siehe Abb. 3-42) lokalisierte PP2C-YFP auch in den stabil-transformierten *Arabidopsis*-Linien hauptsächlich im Nucleus (Abb. 3-46A). Auffällig war, dass dies hauptsächlich in Nuclei der Stomata beobachtet werden konnte. Im Vergleich zur Komplementationslinie *35S::CPK28-YFP* (Abb. 3-46B) mit Wildtypphänotyp, die ein gleichmäßiges Expressionsmuster der CPK28-YFP an der Plasmamembran aller Zelltypen aufwies, konnte für *35S::PP2C-YFP* eine erhöhte Anzahl an Stomata pro Mikroskopieausschnitt beobachtet werden.

3.4.4.2. Markergenexpression in *pp2c* und *35S::PP2C-YFP*

Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung der Genexpressionsmuster der Linien mit Deregulation der PP2C-Expression im Vergleich zu den bisher beschriebenen CPK28-Funktionsverlust- und –gewinnmutanten. Sämtliche Linien wurden auf Genexpression der für die *cpk28*-Mutanten analysierten Markergene untersucht (Abb. 3-47).

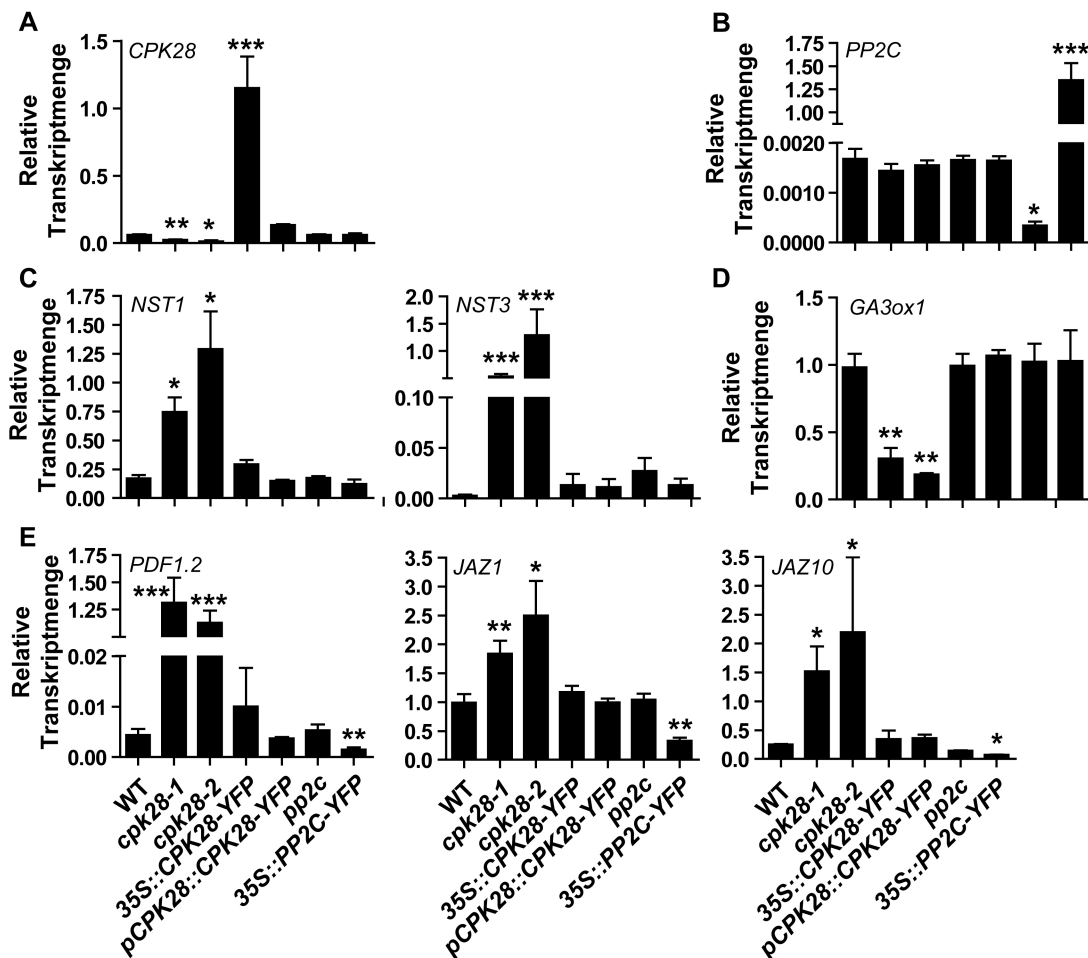


Abbildung 3-47: Markergenanalyse in PP2C-Funktionsverlust- und -gewinnmutanten. Expressionsanalyse von *CPK28* (A), *PP2C* (B), Markergenen des sekundären Dickenwachstums *NST1* und *NST3* (C), des GA-abhängigen Markergens *GA3ox1* (D) bzw. des JA-responsiven Gens *PDF1.2* und der JA-Signaltransduktionskomponenten *JAZ1* und *JAZ10* (E) in Wildtyp, *cpk28*-Insertionslinien, Komplementationslinien *35S::CPK28-YFP* und *pCPK28::CPK28-YFP*, *pp2c* und *35S::PP2C-YFP* (31 Tage LD) mittels qRT-PCR. Werte stellen den Durchschnitt dreier biologischer Replikate \pm Standardfehler dar (zwei technische Replikate pro biologischem Replikat).

Die Analyse der *CPK28*-Genexpression ergab keinerlei Abweichung vom Wildtypniveau der Phosphatase-Funktionsverlust oder auch -gewinnmutanten (Abb. 3-47A). *cpk28-1* und *cpk28-2* wiesen geringere Transkriptmengen auf als der Wildtyp, die Überexpressionslinie *35S::CPK28-YFP* zeigte deutliche Transkriptakkumulation und sowohl die Komplementationslinie mit nativem Promotor, *pCPK28::CPK28-YFP* als auch *pp2c* und *35S::PP2C-YFP* zeigten Genexpression auf Wildtypniveau. Im Fall der *PP2C*-Genexpression konnte in den *cpk28*-Insertionslinien und auch in beiden *CPK28*-Komplementationslinien (native und Überexpression) kein Unterschied zur Wildtyp-Transkriptmenge beobachtet werden (Abb. 3-47B). Die *pp2c*-Insertionslinie zeigte wie erwartet eine Reduktion der Genexpression und der Überexpressor *35S::PP2C-YFP* wies in der Tat eine drastische *PP2C*-Transkriptakkumulation auf. Die Markergenanalyse der Regulatoren des sekundären Dickenwachstums und des Gibberellinsäuremetabolismus' ergab keine Veränderung der Genexpression in *pp2c* und *35S::PP2C-YFP* im Vergleich

zum Wildtyp (Abb. 3-47C,D). Sowohl für *NST1* und *NST3* als auch für *GA3ox1* wurde keine signifikante Abweichung der Transkriptmenge vom Wildtyplevel nachgewiesen. Einzig für Markergene im JA-Metabolismus konnte veränderte Genexpression durch Deregulation der *PP2C*-Expression beobachtet werden (Abb. 3-47E). Funktionsverlust der Phosphatase führte zwar nicht zu einer Modifikation des Expressionsprofils des Markergens *PDF1.2* oder der Signaltransduktionskomponenten *JAZ1* und *JAZ10*. Interessanterweise konnte jedoch in den Linien mit *PP2C*-Überexpression eine signifikante Reduktion der Genexpression der JA-Markergene festgestellt werden.

Zusammenfassend war die in dieser Arbeit durchgeführte Interaktionsanalyse für CPK28 nur mäßig erfolgreich. Es wurden nur wenige Kandidaten isoliert, deren Bearbeitung bis auf die später diskutierte PP2C im Fortschritt der Analysen eingestellt wurde. Dies kann an der Tatsache liegen, dass die Y2H-Analyse mit CPK28 mit Vollängen-Wildtyp-Protein als Köder durchgeführt wurde, wobei für andere CDPKs verbesserte Interaktionen im Hefe-System bei Verwendung katalytisch nicht aktiver bzw. verkürzter Varianten festgestellt wurden (Patharkar und Cushman 2000, Lee *et al.* 2003). Allgemein betrachtet gibt es zur Substrat-Identifikation von Pflanzenproteinen, gerade auch strukturell so nahverwandter Proteine wie CDPKs, vielleicht geeignetere Systeme als die heterologe Y2H-Analyse. Die Entwicklung von *in planta*-Interaktionsanalysen im Protoplasten-Expressionssystem, bei denen Split-Ubiquitin- oder BiFC-Detektionsmechanismen angewendet werden (Fujikawa und Kato 2007, Li *et al.* 2011, Berendzen *et al.* 2012), bieten die Möglichkeit, die oft unspezifischen Reaktionen im heterologen Hefe-System zu vermeiden. Pflanzenspezifische posttranslationale Modifikation und Unabhängigkeit von der subzellulären Protein-Lokalisation, ohne die Notwendigkeit der kernlokalisierten Interaktion zur transkriptionellen Aktivierung des Selektionsmechanismus' wie im Y2H-System, können die Detektionsrate funktional relevanter *in vivo*-Interaktionen durchaus steigern. Mit der rapiden Verbesserung massenspektrometrischer Analysen in den letzten Jahren können auch biochemische Ansätze zur Detektion von *in vivo*-Substraten beitragen. Hier wäre beispielsweise CPK-Koimmunopräzipitation oder spezifische Anreicherung von Phospho-Proteinen nach Expression des CPK-Kandidatenproteins im biologischen System, vorzugsweises unter Verwendung des - soweit bekannt - CPK-aktivierenden Stimulus, und anschließende Identifikation per Massenspektrometrie denkbar.

Die hier beschriebene Identifikation von zwei putativ zellwand-assoziierten Proteinen als Interaktoren, nämlich Glyk mit Ähnlichkeit zu Glykosylhydrolasen und dem Protease-inhibitor Cys, in massenspektrometrischen Analysen als zellwand-assoziiertes Protein aus Zellwandfraktionen isoliert (Boudart *et al.* 2005, Irshad *et al.* 2008), könnte einen Hinweis

auf die später diskutierte Funktion der CPK28 in der zellwand-abhängigen Signaltransduktion (4.4.2.) geben. Glykosylhydrolasen sind am Umbau bzw. der Degradation der Zellwand beteiligt (Cosgrove 2005), was möglicherweise Aktivierung der CPK28 beeinflussen könnte. Akkumulation vieler Abwehrsubstanzen, unter anderem auch Proteaseinhibitoren, konnte nach Verwundung bzw. Insektenfraß lokal an der Läsionsstelle detektiert werden, wobei diese Antworten auch Lignifizierung und Zellwandverhärtung mit sich bringen können (Ebel und Mithöfer 1998, Wu und Baldwin 2010). Dies ist unumstößlich mit der Aktivierung von Calcium und auch der JA-Antwort in der Pflanze verbunden, was einen Zusammenhang zu CPK28 im JA-Metabolismus (4.3.3.) herstellen könnte. Direkte Interaktion dieser Proteine mit CPK28 konnte jedoch im Verlauf der Arbeit nicht verifiziert werden.

Der Calcium-Sensor CaS ist ein in der Literatur viel-diskutiertes und umstrittenes Protein, für das unterschiedliche Lokalisationen und diverse Funktionen calcium-induzierter Vorgänge im abiotischen und auch biotischen Bereich beschrieben wurden (Han *et al.* 2003, Weinl *et al.* 2008, Nomura *et al.* 2012). Die in dieser Arbeit detektierte Lokalisation im Chloroplasten (Abb. 3-42) und die beschriebenen Funktionen für CaS lassen eine *in vivo*-Interaktion mit der membran-assoziierten CPK28 eher unwahrscheinlich erscheinen. Calcium-abhängige Phosphorylierung rekombinanter CaS-Proteine konnte gezeigt werden, allerdings wurde die Kinasereaktion mit Chloroplasten-Rohextrakt durchgeführt (Stael *et al.* 2012), der CPK28 mutmaßlich nicht beinhaltete. Calcium-abhängige Regulation des CaS-Proteins durch eine CPK scheint also durchaus vorstellbar, allerdings stellen vermutlich andere, beispielsweise plastid-lokalisierte CPKs, geeignetere Kandidaten für eine *in vivo*-Interaktion dar als CPK28.

Nachdem die Untersuchung der Interaktion mit CPK28 für die drei eben beschriebenen Proteine wenig erfolgreich war und im Lauf der Experimente eingestellt wurde, werden diese putativen Interaktoren im weiteren Fortgang der Arbeit nicht mehr berücksichtigt.

4. Diskussion

Der Pflanzenentwicklung und der daraus resultierenden morphologischen Variabilität liegen speziesspezifische genetische Prädispositionen zugrunde, die von diversen Umweltparametern wie Licht oder Temperatur, aber auch biotischen Reizen wie Pathogenbefall beeinflusst werden. Diese Faktoren kombinierend müssen Pflanzen ihre Entwicklungsprozesse anpassen, um generationen-übergreifendes Fortbestehen zu sichern. Einer Phase des vegetativen Wachstums zur Generierung von Biomasse folgt dann, meist als Reaktion auf entsprechend günstige Umweltbedingungen, das Umschalten in die reproduktive Phase, nicht zuletzt unterstützt durch wichtige Wachstumsregulatoren, die Phytohormone (Franklin und Quail 2010, Depuydt und Hardtke 2011).

In dieser Arbeit wird die calcium-abhängige Proteinkinase CPK28 aus *Arabidopsis thaliana* als essentielle, regulatorische Komponente für stadienspezifische Entwicklungsprozesse, nämlich Sprosselongation, vaskuläre Entwicklung und den Hormonhaushalt der Pflanze charakterisiert, und Proteininteraktionsanalysen und die biochemische Charakterisierung des CPK28-Proteins werden beschrieben.

4.1. Biochemische Charakterisierung der CPK28

4.1.1. Die calcium-abhängige Proteinkinase CPK28

Für AtCPK28 konnte calcium-abhängige Kinaseaktivität *in vitro* gezeigt werden (Abb. 3-37A), was entsprechend der Konsensussequenz der vier EF-Hände in der calcium-bindenden Domäne des Proteins erwartet wurde. Die Aktivität stieg sowohl mit zunehmender Inkubationszeit als auch mit zunehmender Calcium-Konzentration im Reaktionsansatz an und erreichte mit Syntide 2 als synthetischem Phosphorylierungs-substrat eine maximale fünffache Aktivitätssteigerung nach Calciumgabe (Abb. 3-37B,C). Hiermit konnte also zum ersten Mal calcium-abhängige *in vitro*-Aktivität für CPK28 nachgewiesen werden. Unterschiedliche Studien zur Aktivitätsanalyse von CPKs, einerseits zur Untersuchung der Calcium-Aktivierbarkeit der Kinaseaktivität (Boudsocq *et al.* 2012), andererseits zur Untersuchung der Substratspezifität (Curran *et al.* 2011) schlossen CPK28 nicht ein. Verkürzung des C-Terminus und damit Eliminierung der calcium-bindenden Domäne führt zu calcium-unabhängiger, konstitutiver Kinaseaktivität (Harmon *et al.* 1994, Harper *et al.* 1994). Diese calcium-unabhängige Kinaseaktivität konnte in der Tat für die verkürzte VK-Version der CPK28 beobachtet werden (Abb. 3-37A), womit diese Variante eine konstitutiv-aktive Proteinversion darstellt. Veränderung der subzellulären Lokalisation des Proteins durch Veränderung des Myristoylierungs-motivs (Aminosäureaustausch G2A) führte zur Veränderung des

Expressionsorts in der Zelle (Abb. 3-15B), jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung der *in vitro*-Phosphorylierungsaktivität der CPK28 (Abb. 3-37A). Lokalisation und Funktionalität der CPK28-Proteinversionen *in vivo* werden in 4.2.3. bzw. 4.2.4. diskutiert. In Experimenten zur Substratspezifität konnten Unterschiede in der calcium-abhängigen Phosphorylierung für verschiedene Standardpeptide aus *Arabidopsis* bestätigt werden, wobei bei den untersuchten Peptiden der RBOHD mit sechs- bzw. achtfacher Aktivitätssteigerung die maximal-beobachtete CPK28-Aktivität erzielt werden konnte (Abb. 3-38). Syntide 2 als synthetisches Peptidsubstrat, dessen Phosphorylierung durch CPK28 mit Fünffach-Aktivierung nach Calcium-Gabe erfolgte, ist seit langem als geeignetes *in vitro*-Substrat für CDPKs bekannt (Harmon *et al.* 1994, Harper *et al.* 1994). Aus der *in vitro*-Aktivität können jedoch nicht zwangsläufig Aussagen über die *in vivo*-Aktivität getroffen werden. Bei der Untersuchung von vier *Arabidopsis*-CPKs wurden große Überlappungen der *in vitro*-Phosphorylierung von 103 unterschiedlichen Substraten durch die einzelnen CPKs festgestellt, wobei auch isoformspezifische *in vitro*-Substrate identifiziert werden konnten (Curran *et al.* 2011). Nachdem in dieser Studie beispielsweise für CPK1 Phosphorylierung von 64 unterschiedlichen Substraten beobachtet werden konnte und eine derartige *in vivo*-Situation nicht unbedingt wahrscheinlich ist, scheint ein Heranziehen von *in vitro*-Phosphorylierungsdaten für eine Vorhersage der *in vivo*-Relevanz nur in beschränktem Maße zulässig. Zur Identifizierung des tatsächlichen *in vivo*-Substrats der CPK28 könnten Interaktionsanalysen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, oder auch massenspektrometrische Methoden beitragen, die beispielsweise das Phospho-Proteom von Pflanzenmaterial mit Expression von (konstitutiv-)aktiver CPK28 im Vergleich zur inaktiven Kinase untersuchen.

4.1.2. Analyse der Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495

Die massenspektrometrische Analyse von Phosphorylierungsstellen der CPK28 nach Expression in *Arabidopsis*-Mesophyllzellprotoplasten konnte die bereits bekannten, in rekombinanten Proteinen identifizierten *in vitro*-Auto-Phosphorylierungsstellen S228, S318 und S495 (Hegeman *et al.* 2006) *in vivo* bestätigen (Abb. 3-39). Hierbei zeigte sich für S318 und S495 eine deutliche Zunahme des entsprechenden Phospho-Peptids, wenn die aktive Kinase exprimiert wurde. Im Gegensatz zum Ansatz mit kinase-inaktivem Protein wurde das Phospho-Peptid für S228 weniger stark induziert, es konnte nur vierfache Anreicherung bei Expression der aktiven Kinase beobachtet werden. In der erwähnten Auto-Phosphorylierungsstudie rekombinanter CPKs konnten Hegemann und Mitarbeiter fünf konservierte CPK-Auto-Phosphorylierungsloci entsprechend der phylogenetischen Verwandtschaft der untersuchten CPKs feststellen, zu denen S228 (konservierter Locus I in der Kinasedomäne) und S495 (konservierter Locus III in der

vierten EF-Hand) der CPK28 gehören (Hegeman *et al.* 2006). Interessanterweise besitzen nur CPK16 und CPK28 aus Untergruppe IV im *Arabidopsis*-Stammbaum ein phosphoryliertes Serin an dieser Position, während für andere CPKs unphosphorylierte Peptide am vergleichbar positionierten Serin nachgewiesen werden konnten. Dies könnte auf einen spezifisch konservierten, regulatorischen Mechanismus dieser Phosphorylierungsstelle hinweisen und vielleicht Calcium-Bindung beeinflussen (Hegeman *et al.* 2006). Locus I innerhalb der Kinase-Domäne liegt in räumlicher Nähe des aktiven Zentrums und wurde als regulatorische Stelle für Kinaseaktivierung und/oder Substratbindung diskutiert (Hegeman *et al.* 2006).

In vitro-Kinaseaktivitätsanalysen ergaben eine Bedeutung der in der Kinasedomäne liegenden Serine S228 und S318 für die Substratphosphorylierung von Syntide 2. Der Austausch der beiden Serine zu Alanin (unphosphorylierbar) oder Aspartat (Imitation einer Phosphorylierung durch Einführung einer negativen Ladung) resultierte in deutlich niedrigerer, jedoch immer noch calcium-induzierbarer Kinaseaktivität im Vergleich zum Wildtypprotein (Abb. 3-40), wobei hier Verlust und Imitation der Phosphorylierung nicht gegensätzlich wirkten, sondern beide zu Einschränkung der Aktivität führten. Reduzierte CPK-Aktivität könnte, wie postuliert, durch räumliche Nähe der beiden Phosphorylierungsstellen zum aktiven Zentrum der Kinase in darin resultierender veränderter Substratbindung oder anderer struktureller Veränderungen begründet sein (Hegeman *et al.* 2006). Phospho-Varianten von S495 in der calciumbindenden-Domäne führten zu keiner Beeinträchtigung der calcium-abhängigen Kinaseaktivität (Abb. 3-40), obwohl diese Phosphorylierungsstelle direkt in der vierten EF-Hand liegt. Der postulierte Einfluss auf die Calcium-Aktivierbarkeit der CPK28 (Hegeman *et al.* 2006) kann also verneint werden, wobei veränderte Calcium-Bindung der C-terminalen EF-Hände 3 oder 4 auch einen weniger gravierenden Einfluss auf die Calcium-Aktivierbarkeit der CPK28 haben könnte als die N-terminalen EF-Hände 1 und 2, wie für CPK21 gezeigt (Franz *et al.* 2011). Die Bedeutung der untersuchten Phosphorylierungsstellen für die Trans-Phosphorylierung konnte auch für die Auto-Phosphorylierungsaktivität bestätigt werden (nicht gezeigt). Nach Analyse der vollständigen *in vitro*-Kinasereaktionen per SDS-PAGE und anschließender Detektion radioaktiv-markierten CPK28-Proteins mittels Autoradiographie wurde eine schwächere Auto-Phosphorylierung für beide Phospho-Varianten (S228 und S318) detektiert. Die *in vivo*-Funktionalität der verschiedenen Phospho-Varianten wird unter 4.2.4. beschrieben und diskutiert.

Generell kann für die analysierten Phosphorylierungsstellen der CPK28 also kein Mechanismus ähnlich dem für mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder SNF-verwandte Serin/Threonin-Kinasen (SnRK) beobachtet werden, in dem Einführung einer Phospho-Imitation innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne in konstitutiv-

aktivem Protein resultiert (Yang *et al.* 2001, Boudsocq *et al.* 2007). Die genaue Funktion der Auto-Phosphorylierung in CPKs ist viel diskutiert und bisher nicht geklärt, eine Korrelation von stressinduzierter Phosphorylierung und Kinaseaktivität konnte jedoch gezeigt werden (Romeis *et al.* 2001, Witte *et al.* 2010). Durch Phosphorylierung bedingte strukturelle Veränderungen, worauf verändertes Laufverhalten phosphorylierter CDPKs in Elektrophorese-Analysen hindeuten (Romeis *et al.* 2001, Witte *et al.* 2010), könnten zu verändertem Substratzugang, veränderten Bindungseigenschaften mit interagierenden Proteinen oder Veränderung der Calcium-Bindung führen und damit direkt oder indirekt Kinaseaktivität modifizieren. Im Kontext der Aufklärung von Struktur und Aktivierungsmechanismen der CDPKs (Wernimont *et al.* 2011) könnte Auto-Phosphorylierung auch zur Stabilisierung der entweder inaktiven oder aktiven Proteinkonformation beitragen (Liese und Romeis 2012).

In den durchgeführten CPK28-Analysen wurden keine Phosphorylierungsstellen in der variablen Domäne identifiziert. Stimulus-abhängige Auto- und Trans-Phosphorylierung der N-terminalen Domäne konnte beispielsweise für CDPKs aus Tabak gezeigt werden (Witte *et al.* 2010), und wird unter anderem im Zuge der Substratspezifität diskutiert (Ito *et al.* 2010, Witte *et al.* 2010). In den Auto-Phosphorylierungsstudien rekombinanter *At*CPKs wurde fast die Hälfte der identifizierten Phosphorylierungen in der N-terminalen Domäne detektiert (Hegeman *et al.* 2006). Diese Häufung könnte auf Regulation der Substratspezifität mittels dieser Modifikationen hinweisen. Aufgrund der hohen Varianz der CPKs innerhalb der Proteinsequenz der variablen Domäne (Cheng *et al.* 2002) muss gerade in der relativ distinkten Untergruppe IV, zu der CPK28 gehört, jedoch nicht zwangsläufig Übereinstimmung mit konservierten Phosphorylierungsstellen anderer Untergruppen gegeben sein. Die Existenz einer potentiellen 14-3-3-Bindestelle im N-Terminus der CPK28 (Cheng *et al.* 2002), die eine Phosphorylierung zur Bindung eines 14-3-3-Proteins voraussetzt, gibt Hinweise auf weitere, in dieser Arbeit nicht identifizierte Phosphorylierungsstellen der CPK28. Hier wären unter anderem auch durch vorgeschaltete Kinasen modifizierte Phosphorylierungsstellen interessant, die in Auto-Phosphorylierungs-Experimenten nicht detektiert werden können. Diese könnten in einem massenspektrometrischen Ansatz mit aufgereinigtem CPK28-Protein, vielleicht nach Gabe unterschiedlicher Stimuli, identifiziert werden.

4.2. Analyse der *in vivo*-Funktion der CPK28

4.2.1. *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien – Funktionsverlustmutanten oder nicht?

Die Lage der T-DNA-Insertionen in den untersuchten Linien *cpk28-1* und *cpk28-2* jeweils hinter der Kinasedomäne (Abb. 3-1) bietet die Möglichkeit der Expression eines funktionalen, verkürzten *CPK28*-Transkripts, vielleicht ähnlich einer konstitutiv-aktiven VK-

Version. Somit könnten die untersuchten Linien also Funktionsgewinnmutanten durch Expression einer konstitutiv-aktiven Proteinvariante darstellen. Diese Eventualität wird durch die tatsächliche Expression von Resttranskripten in beiden Linien unterstützt (Abb. 3-2). Genetische Analysen der beiden Insertionslinien wie auch Ergebnisse der Komplementationsexperimente widersprechen dieser Argumentation jedoch: einerseits bilden heterozygote *cpk28*-Linien keinen *cpk28*-spezifischen Phänotyp aus (Abb. 3-3). Im Falle der Expression von funktionalem Resttranskript sollte dies auch in heterozygoten Pflanzen erfolgen. Bei nur einer vorliegenden mutierten Genkopie wäre die Proteinexpression möglicherweise schwächer als in homozygoten T-DNA-Insertionslinien, jedoch würde man proteindosis-abhängig zumindest einen intermediären Phänotyp vermuten. Kreuzungen zwischen Wildtyp und *cpk28*-Pflanzen weisen jedoch Wildtypaussehen auf, was gegen eine Funktionsgewinnmutation in den verwendeten Linien spricht. Andererseits kann der *cpk28*-Phänotyp sowohl durch Expression des aktiven CPK28-Vollängenproteins als auch der verkürzten VK-Variante komplementiert werden, wobei kein Überexpressionsphänotyp beobachtet wird (Abb. 3-16, 3-22). Falls ein konstitutiv-aktives CPK28-Protein in *cpk28* ursächlich für den Phänotyp wäre, könnte gerade bei Expression der VK-Variante keine phänotypische Komplementation erfolgen, wenn durch das eingeführte Transgen nur noch zusätzliches, konstitutiv-aktives Protein exprimiert werden würde.

Des Weiteren konnte im Labor kürzlich eine weitere T-DNA-Insertionslinie in Exon 3 der *CPK28*-Sequenz charakterisiert werden, die auch den *cpk28*-Sprosselongationsphänotyp aufweist (Linie WiscDsLox264D03 aus der WiscDsLox-T-DNA-Insertions-Kollektion (Woody *et al.* 2007), Daten nicht gezeigt). Der Insertionsort innerhalb der Kinasedomäne lässt kein funktionales VK-Resttranskript zu. Diese Gründe führen zu dem Schluss, dass es sich bei den verwendeten Insertionslinien *cpk28-1* und *cpk28-2* um Funktionsverlustmutanten der CPK28 handelt und die nachgewiesenen Resttranskripte (Abb. 3-2) nicht in funktionales Protein übersetzt werden.

4.2.2. Der Entwicklungsphänotyp in *cpk28* – keine Redundanz innerhalb der CPK-Familie

Kreuzungsexperimente unabhängiger Insertionslinien mit gleichem Phänotyp zeigen, ob die durch die Insertion entstandene Mutation im selben Gen tatsächlich die Ursache für einen beobachteten Phänotyp darstellt. Wenn in der ersten Folgegeneration (F1), in der nach Mendelscher Vererbung beide Allele heterozygot vorliegen, der für die Elternlinien charakteristische Phänotyp immer noch sichtbar ist, spricht das für die Relevanz der entsprechenden Mutationen im gleichen Gen hinsichtlich des Phänotyps. Bei reziproker Kreuzung der Linien *cpk28-1* und *cpk28-2* traten in der F1-Generation nur Pflanzen mit

der Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps auf (Abb. 3-4). Dies und die Tatsache, dass durch Expression funktionalen CPK28-Proteins eine vollständige Komplementation des *cpk28*-Phänotyps erreicht werden kann (Abb. 3-16 bis 3-18), belegen den CPK28-Verlust als Ursache des Phänotyps.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Bedeutung einer einzelnen calcium-abhängigen Proteinkinase, aus einer Proteinfamilie mit 34 Mitgliedern stammend, als regulatorische Komponente für das reproduktive Wachstum. Zwei unabhängige Insertionslinien zeigten einen identischen Sprosselongationsphänotyp, der durch reduzierte Sprosshöhe, deformierte Blätter, reduzierten Rosettendurchmesser und Anthocyanakkumulation charakterisiert ist (Abb. 3-5, 3-7, 3-8) und entwicklungspezifisch erst nach dem Übergang in die reproduktive Phase auftritt (Abb. 3-6). Außerdem konnten in *cpk28*-Mutanten Veränderungen der Sprossanatomie, verstärktes sekundäres Dickenwachstum mit ektopischer Lignindeposition (Abb. 3-10, 3-11) und Deregulation des GA- bzw. JA-Haushalts beobachtet werden (Abb. 3-26 bis 28, 3-33 bis 36). Der Funktionsverlust einer einzelnen CPK führt im hier beschriebenen Fall zu einem robusten Phänotyp, während die Familie der calcium-abhängigen Proteinkinasen in der Regel durch hohe funktionelle Redundanz charakterisiert ist. Diverse Prozesse wie die abiotische Stressantwort (Franz *et al.* 2011), Signaltransduktion in der nichtwirtsspezifischen Immunität (Boudsocq *et al.* 2010) oder auch das Pollenschlauchwachstum (Myers *et al.* 2009) werden durch das oft funktionsüberlappende bzw. redundante Zusammenspiel mehrerer CPKs reguliert, weshalb bei Einzelmutation einer CPK selten ein Phänotyp zu beobachten ist. Die deutliche Alleinstellung der CPK28 innerhalb des CPK-Stammbaumes in *Arabidopsis thaliana*, in Untergruppe IV mit nur drei Mitgliedern (Abb. 1-2) (Cheng *et al.* 2002), könnte eine Erklärung für das Auftreten des Phänotyps bei Verlust dieser einzelnen CPK bieten. Damit stellt CPK28 einen der ersten Vertreter aus der Familie der CPKs mit einem klar ausgeprägten Entwicklungsphänotyp dar, der calcium-aktivierte Signaltransduktion direkt mit der Regulation eines Entwicklungsprozesses in Verbindung bringt.

4.2.3. Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisation von CPK28

Promotor::*GUS*-Analysen der *CPK28* weisen Expression hauptsächlich in der Vaskulatur und in meristematischen Geweben während der gesamten Pflanzenentwicklung nach. Im Sprossquerschnitt konnte Expression der CPK28 im Xylem, vorrangig in Parenchymzellen lokalisiert werden (Abb. 3-14), was die später beschriebene Bedeutung dieser Kinase für die Xylementwicklung (4.2.6., 4.3.2.) erklären könnte. Während der hier dokumentierte *cpk28*-Phänotyp nur in der reproduktiven Phase der Entwicklung beobachtet werden kann, findet Expression des Proteins während der kompletten Pflanzenentwicklung statt. Diese Daten decken sich mit dem Expressionsprofil für CPK28 in öffentlich zugänglichen

Datenbanken wie dem eFP-Browser (Winter *et al.* 2007). Dies wirft die Möglichkeit einer bisher unbeachteten CPK28-Funktion im vegetativen Stadium auf, die die Calcium-Signaltransduktion zusätzlich zur hier beschriebenen Funktion moduliert. Hierzu könnten Untersuchungen mit Pflanzen in der vegetativen Phase unter verschiedenen abiotischen oder biotischen Stressbedingungen Aufschluss geben, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Sämtliche hier beschriebenen Versuche mit vegetativen Pflanzen (licht- bzw. hormoninduzierte Hypocotylelongation oder Keimungstests (Abb. 3-24, 3-30)) gaben keine Hinweise auf eine mögliche CPK28-Funktion im vegetativen Wachstum.

Als subzelluläre Lokalisation konnte für CPK28 die Plasmamembran bestätigt werden (Abb. 3-15). Hierbei wurde mittels konfokaler Mikroskopie sowohl für YFP-markiertes Wildtypprotein als auch für die verkürzte Variante ausschließlich membranassoziierte Lokalisation beobachtet. Koexpression mit dem cytosolischen mCherry-Protein zeigte keine räumliche Überlagerung der unterschiedlichen Fluoreszenzen. Im Gegensatz dazu wurde in der CPK28-Proteinversion mit einem Austausch der Myristoylierungsstelle (G2A) eine Veränderung der subzellulären Lokalisation beobachtet, CPK28-G2A wurde im Cytosol und im Nucleus detektiert, kolokalisierte also mit mCherry. Diese Ergebnisse bestätigen bereits durchgeführte Studien zur CPK28-Lokalisation an der Plasmamembran (Dammann *et al.* 2003), wobei für die G2A-Variante neben der beschriebenen Kernlokalisierung (Mehlmer 2008) zusätzlich cytosolisches G2A-Protein beobachtet wurde.

4.2.4. CPK28-Enzymvarianten und ihre *in vivo*-Funktionalität

Die Relevanz der CPK28-Kinaseaktivität konnte in *in vivo*-Experimenten bestätigt werden, Komplementationsanalysen zeigten die Bedeutung der CPK28 für die Sprosselongation und Kontrolle des sekundären Dickenwachstums in der reproduktiven Wachstumsphase. Während aktive CPK28 den Phänotyp vollständig revertieren konnte, führte Expression der inaktiven Kinase CPK28-D188A nicht zur Komplementation der *cpk28*-Merkmale (Abb. 3-16). Die Funktion der CPK28 ist also essentiell für die normale Sprossentwicklung in *Arabidopsis thaliana*.

Interessanterweise zeigten Linien mit 15- bis 20-facher Erhöhung des *CPK28*-Transkriptlevels keinen erkennbaren Überexpressionsphänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-16), sämtliche phänotypischen *cpk28*-Merkmale wurden auf Wildtyp-Niveau revertiert. Auch Komplementationslinien, die die konstitutiv-aktive VK-Variante exprimierten, wiesen Wildtypaussehen auf (Abb. 3-22), während Expression des inaktiven VK-Proteins keine Verbesserung des Sprosselongationsphänotyps erzielte. Insgesamt konnte also kein CPK28-*gain-of-function*-Phänotyp, beispielsweise verstärkte Sprosselongation im Vergleich zum Wildtyp, festgestellt werden. Allerdings zeigten Pflanzen mit

konstitutiv-aktivem CPK28-VK-Protein im Vergleich zu Linien mit der inaktiven VK-Variante oder auch Vollängenprotein deutlich reduzierte Proteinlevel (Abb. 3-22), was auf spezifische Regulation dieser Proteinvariante auf Expressionsebene oder verstärkten Proteinabbau hindeutet. Da die VK-Version ohne Calcium-Bindedomäne nicht mehr calcium-regulierbar (Abb. 3-37) und damit konstitutiv-aktiv ist, wird die Aktivität dieses Proteins vermutlich durch sein Gehalt kontrolliert. Neben posttranslationaler Modifikation kann Regulation der calcium-aktivierbaren Variante auch durch Calcium-Bindung stattfinden, während sich bei inaktiven Varianten die Notwendigkeit der Aktivitätsregulation wahrscheinlich erübrigt. Überwachung der Proteinmenge erscheint in diesen Situationen also nicht so essentiell wie im Fall der konstitutiv-aktiven CPK28. Diese Expressionsregulation wurde auch für andere verkürzte, konstitutiv-aktive CPK-Varianten festgestellt (laborinterne Daten), was die Bedeutung der *in vivo*-Aktivierung durch spezifische Calcium-Stimuli untermauert.

Für die CPK28-G2A-Variante wurde trotz voller Funktionalität der Kinase keine vollständige Reversion des Sprosselongationsphänotyps beobachtet (Abb. 3-21, 3-37). Expression der delokalisierten Kinase führte zu großer Varianz der Pflanzenmorphologie, wobei Sprosselongation und Rosettendurchmesser als phänotypische Parameter unterschiedlich zu Wildtyp und *cpk28* waren. Dies belegt die essentielle Bedeutung der Membranlokalisierung für die volle Funktionalität der CPK28. Als membranassoziiertes Protein kann bei cytosolischer Lokalisation vielleicht ein gewisser Anteil der biologischen Funktion ausgeführt werden, falls räumliche Nähe zu (putativ membranassoziierten) Substraten gegeben ist. Vollständige *in vivo*-Aktivität der Kinase wird aber offensichtlich nicht mehr erreicht. Die Relevanz der Myristoylierung für die Lokalisation und auch die Kinaseaktivität *in vivo* konnte für *NtCDPK2* aus Tabak gezeigt werden, deren Delokalisation zur Reduktion der Zelltodinduktion im Vergleich zur Wildtyp-*NtCDPK2* führte. Hier ging veränderte Lokalisation des G2A-Proteins auch mit Verlust einer N-terminalen Trans-Phosphorylierung einher (Witte *et al.* 2010). Die richtige Lokalisation der Kinasen kann essentiell für den Zugang zu *in vivo*-Substraten sein. Direkte Interaktion von *NtCDPK1* mit seinem Substrat RSG im Gibberellinsäure-metabolismus wurde jedoch durch die G2A-Mutation nicht beeinflusst (Ito *et al.* 2010), fehlende CPK-Funktionalität scheint also eher in veränderter Proteinlokalisierung in der Zelle als in Veränderung der Substratinteraktion begründet zu sein. Ebenso kann die richtige Lokalisation auch Modifikation durch vorgeschaltete Enzyme und damit möglicherweise essentielle Aktivierungsstimuli erlauben. Nachdem Phospholipide zur Aktivitätsstimulierung von CDPKs beitragen (Klimecka und Muszynska 2007), könnte dies ein weiterer Grund für die Notwendigkeit der Membranassoziation für volle *in vivo*-Funktionalität der CPK28 sein.

Die untersuchten Phosphorylierungs-Varianten der CPK28, S228A/D, S318A/D und S495A/D lieferten ein überraschendes Bild bezüglich ihrer *cpk28*-Komplementationsfähigkeit *in vivo*. Trotz reduzierter Kinaseaktivität beider S228- und S318-Varianten (Abb. 3-40) konnten alle untersuchten Phospho-Varianten den *cpk28*-Sprosselongationsphänotyp *in vivo* beheben (Abb. 3-41). Für *NtCDPK2* und *NtCDPK3* wurde eine genau gegensätzliche Beobachtung gemacht: Phospho-Varianten der *in vivo*-identifizierten Phosphorylierungsstellen zeigten keine Veränderung der Syntide 2-Phosphorylierung *in vitro*, riefen jedoch leicht stärkere Zelltod-Symptome als das Wildtypprotein im *in vivo*-Funktionsnachweis hervor (Witte *et al.* 2010). Diese Unterschiede könnten einerseits dadurch erklärt werden, dass *in vitro*-Kinaseexperimente mit dem synthetischen Peptid Syntide 2 als Substrat nicht die *in vivo*-Situation widerspiegeln. Im Fall der CPK28 könnte also dennoch das geeignete Substrat auch von den Phospho-Varianten mit reduzierter *in vitro*-Aktivität ausreichend phosphoryliert werden. *In vivo* könnten sowohl Substratspezifität als auch weitere regulatorische Komponenten zu maximaler CPK-Aktivität beitragen (Liese und Romeis 2012), die in *in vitro*-Versuchen nicht reproduziert werden können. Andererseits wurden die *in vivo*-Phosphorylierungsstellen der CPK28 nach Proteinexpression in Mesophyllzellprotoplasten vegetativer Pflanzen detektiert, was nicht unbedingt dem *in vivo*-Phosphorylierungsstatus aktiver CPK28 beim Übergang von vegetativer zu reproduktiver Phase entsprechen muss. Auch besteht die Möglichkeit weiterer, bisher nicht identifizierter Phosphorylierungsstellen, die zur Regulation der CPK28-Aktivität beitragen könnten und nicht durch Veränderung der hier identifizierten Phosphorylierungsstellen beeinflusst werden. Nicht zuletzt könnte die reduzierte *in vitro*-Aktivität, wie für die S228- bzw. S318-Varianten bestimmt, ausreichend für die CPK28-Kinasefunktion *in vivo* sein. In diesem Kontext würde CPK28 vielleicht eher als molekularer Schalter dienen, der bei Überschreitung einer gewissen Aktivitätsschwelle die Signaltransduktion zur Sprosselongation induziert und weniger mittels eines Protein-Dosis-Effekts regulatorische Funktion in quantitativer Weise ausübt.

Komplementationsexperimente zur Expression von CPK28-Wildtypprotein unter der Kontrolle gut charakterisierter, gewebespezifischer Promotoren liefern einen Hinweis auf ein, durch CPK28 generiertes oder propagiertes, systemisches Signal zu Aktivierung der Sprosselongation. Sowohl CPK28-Expression unter einem meristematischen (*pKNAT1*) als auch einem phloem-geleitzellen-spezifischen Promotor (*pSUC2*) führte zur Reversion des *cpk28*-Phänotyps (Abb. 3-19, 3-20), obwohl die für diese Promotoren beschriebene Lokalisation (Lincoln *et al.* 1994, Imlau *et al.* 1999) nicht mit dem beobachteten Expressionsprofil für CPK28 übereinstimmt (Abb. 3-14). Dies legt die Vermutung nahe, dass als Konsequenz der CPK28-Aktivität ein mobiles Signal zur Induktion der Sprosselongation und vaskulären Entwicklung generiert werden könnte. Möglicherweise

sind Phytohormone direkt in diese Signaltransduktion involviert, denn mit der später diskutierten Funktion der CPK28 im Gibberellin-Metabolismus (4.3.1.) stellt GA einen möglichen Kandidaten für diese Signalkomponente dar. GA wurde tatsächlich als mobiles Signal identifiziert, welches bi-direktional im Spross transportiert wird und Sprosselongation induziert (Dayan *et al.* 2012). Diese Beobachtungen werden durch Untersuchungen unterstützt, die GA auch als mobiles Signal in der Stimulation der Xylemexpansion während des sekundären Dickenwachstums des Hypocotyls identifizierten (Ragni *et al.* 2011).

4.2.5. Penetranz des *cpk28*-Phänotyps

Unter verschiedenen Anzuchtbedingungen im Gewächshaus, in unterschiedlichen Pflanzenkammern und in Wachstumsschränken konnten immense Unterschiede in der Ausprägung des *cpk28*-Phänotyps beobachtet werden (Abb. 3-23). Anzucht im Wachstumsschrank führte zu einem robusten Phänotyp mit einheitlich stark reduzierter Sprosslänge in *cpk28*, während Wachstum im Gewächshaus zu sehr großer Varianz der einzelnen Pflanzen eines Genotyps führte. Der *cpk28*-Phänotyp blieb jedoch durch reduzierte Sprosselongation, Deformation der Blätter und Anthocyanakkumulation im reproduktiven Stadium immer deutlich erkennbar.

Untersuchungen zur Ursache der morphologischen Unterschiede je nach Anzuchtbedingung beinhalteten neben nicht gezeigten Analysen zu Anzuchtparametern wie Temperatur, Lichtintensität und Saatgutqualität auch Untersuchungen zur Auswirkung der Lichtqualität. In Experimenten zur Hypocotylelongation in den Lichtqualitäten Blau, Rot oder Dunkelrot konnte kein Einfluss einer spezifischen Lichtqualität auf CPK28-vermittelte Elongationsereignisse beobachtet werden (Abb. 3-24). Dies war jedoch auch nicht unbedingt zu erwarten, nachdem für CPK28 bisher keine Funktion im vegetativen Wachstum beobachtet werden konnte. Eine allgemeine Störung der Lichtperzeption oder ein Defekt in einem zentralen Element der Lichtsignaltransduktion, beispielsweise den PIF-Repressoren, kann für *cpk28* damit ausgeschlossen werden, da unter diesen Umständen Unterschiede in der Hypocotylelongation zu erwarten wären (Fankhauser und Casal 2004).

Zusätzlich wurden Experimente zur Sprosselongation in unterschiedlichen Lichtqualitäten durchgeführt, die den Einfluss der Lichtqualitäten auf den *cpk28*-Phänotyp dokumentieren sollten. Hierzu wurde Wachstum bei LED-Belichtung in den Lichtqualitäten Blau und Rot untersucht, außerdem wurde die Sprosselongation nach Belichtung mit LED-generiertem Weißlicht analysiert (Abb. 3-25). Blaulicht führte zu keinem erkennbaren Unterschied der Sprosselongation zwischen Wildtyp und *cpk28*, diese Lichtqualität scheint also keinen Einfluss auf die CPK28-abhängigen Elongationsereignisse zu haben. LED-generiertes

Weißlicht bewirkte eine leichte Reduktion der Sprosslänge in *cpk28*, wobei der deutlichste Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante in der Belichtung mit Rotlicht detektiert werden konnte. Die für die unterschiedlichen Lichtqualitäten beobachteten Blühzeitpunkte stimmen mit den Literaturangaben überein, Pflanzen unter Rotlichtbedingungen blühten signifikant später als unter Weißlicht, während Blaulicht frühes Blühen induzierte (Eskins 1992, Guo *et al.* 1998). Rotlichtbedingungen stellten offensichtlich keine optimalen Wachstumsbedingungen dar, da die analysierten Pflanzen auch im Wildtyp Stressmerkmale wie deformierte Blätter und Seneszenzanzeichen entwickelten (Abb. 3-25). Phytochrome als Rotlichtrezeptoren stellen die Komponenten der Lichtwahrnehmung dar, die hauptsächlich für Spross- und Petiolenelongation verantwortlich sind. Defekte in der Rotlichtperzeption führten zu verstärkter Internodienelongation, teilweise sogar schon im vegetativen Wachstum (Reed *et al.* 1993, Devlin *et al.* 1996, Devlin *et al.* 1998). Funktionale Rotlichtperzeption scheint also Sprosselongation zumindest teilweise zu unterdrücken, wobei diese inhibitorische Wirkung auf die Sprosselongation in Erbsen durch Applikation von Gibberellinsäure unterdrückt werden konnte (Vince 1967). In *cpk28* könnte durch die später diskutierte mutmaßliche GA-Defizienz (4.3.1.) möglicherweise verstärkte rotlicht-induzierte Repression des Sprosswachstums stattfinden, die in Blaulicht nicht und in Weißlicht nur schwach auftritt. Der Zusammenhang zwischen Lichtwahrnehmung bzw. -Signalweiterleitung und dem Hormonhaushalt ist fest etabliert und wird neben den DELLA-interagierenden PIF-Faktoren auch durch den zentralen Integrator HY5 vermittelt (Feng *et al.* 2008, Lau und Deng 2010). Neben Merkmalen wie gesteigerter Hypocotylelongation zeigen *hy5*-Mutanten unter anderem reduzierte Xylemlignifizierung und reduziertes sekundäres Dickenwachstum in der Wurzel, außerdem spielt HY5 eine Rolle in der Anthocyanakkumulation (Oyama *et al.* 1997, Shin *et al.* 2007). Dies entspricht den phänotypischen Charakteristika von *cpk28* nicht vollständig, bestätigt aber einen Einfluss von Licht auf diverse Ausprägungen der CPK28-abhängigen Entwicklung.

Allgemein wurde für *cpk28* unter allen LED-Bedingungen keine so stringente Ausprägung des Phänotyps beobachtet wie im sonst für die Pflanzenanzucht verwendeten Wachstumsschrank mit Tageslichtlampen. Dies könnte durch mutmaßlich verschiedene Zusammensetzung der Lichtspektren von LEDs im Vergleich zu Leuchtstoffröhren begründet sein. Generell lieferten die Untersuchungen zur Penetranz des Phänotyps keine schlüssigen Hinweise auf die CPK28-Funktion, insbesondere der die unterschiedlichen Ausprägungen auslösende Faktor konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Dies mag auch daran liegen, dass beim Vergleich unterschiedlicher Anzuchtbedingungen tatsächlich nicht immer nur ein Faktor spezifisch verändert werden kann, sondern auch andere Einflüsse wie Luftfeuchtigkeit oder Luftzug durch Kühlvorgänge zur Aufrechterhaltung der Temperatur nicht gleich bzw. nicht kontrollierbar sind.

4.2.6. Die Rolle der CPK28 im sekundären Dickenwachstum

Sekundäres Dickenwachstum des Sprosses wird als radiale Expansion und Verholzung spezieller Gewebe sowohl in krautigen Pflanzen als auch Bäumen beschrieben, die durch das Kambium etabliert wird. Dieses differenziert zur Peripherie des Sprossquerschnitts hin zu Phloemgewebe zur effizienten Nährstoffverteilung, zum Sprossinneren hin zu Xylemgewebe mit trachealen Elementen und Parenchymzellen, um Wassertransport und mechanische Stabilität durch lignifizierte Fasern zu gewährleisten (Du und Groover 2010). Funktionsverlust der CPK28 führt neben der Reduktion der Sprosselongation zu verstärktem sekundärem Dickenwachstum mit Defekten in der vaskulären Entwicklung des Xylems und zu ektopischer Lignifizierung eigentlich unverholzter Zelltypen im Spross (Abb. 3-10). Damit übereinstimmend konnte erhöhte Expression von *NST1* und *NST3* in *cpk28* beobachtet werden (Abb. 3-12, 3-13), zweier Hauptaktivatoren des sekundären Dickenwachstums im Infloreszenzspross (Zhang *et al.* 2011). Überexpression von *NST1* oder *NST3* unter dem 35S-Promotor führte zu ektopischer Ausbildung von sekundären Zellwänden in ursprünglichen Parenchymzellen (Mitsuda *et al.* 2005, Mitsuda *et al.* 2007), außerdem wurde in *35S::NST3* eine extreme Verdünnung der Xylemfaserwände festgestellt (Zhong *et al.* 2006), ähnlich wie für *cpk28* beobachtet. Verstärkte Lignifizierung in *cpk28* ist vermutlich das Resultat einer von *NST1* und *NST3* initiierten Transkriptionskaskade zur Ausbildung von sekundären Zellwänden. *NST*-aktivierte MYB-Transkriptionsfaktoren aktivieren bekanntermaßen Gene der Lignin-Biosynthese (Zhong *et al.* 2008).

Der nahverwandte Transkriptionsfaktor *NST2* zeigte keine veränderte Expression in *cpk28* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-13). Für die *NST*-Transkriptionsfaktoren sind zelltyp-spezifische Funktionen beschrieben: während für *NST1* und *NST3* redundante Rollen im sekundären Dickenwachstum des Sprosses beobachtet wurden, zeigen sich *NST1* und *NST2* für das sekundäre Dickenwachstum im Endothecium verantwortlich (Zhong *et al.* 2008). Mit der unveränderten *NST2*-Regulation übereinstimmend zeigten *cpk28*-Mutanten keine Defekte in der Fertilität oder Schotenentwicklung (Abb. 3-3), also andere Prozesse, in denen sekundäre Zellwände in spezifischen Geweben (zur Pollenfreisetzung oder zum Samenauswurf) essentiell sind (Wang und Dixon 2012). Durch die spezifische Deregulation der *NST1*- bzw. *NST3*-Faktoren beschränkt sich der Phänotyp der *cpk28* offensichtlich auf das sekundäre Dickenwachstum im Spross. Die Funktion der CPK28 bewirkt also die zeitliche Koordination nur dieses speziellen Wachstumsvorganges.

Der für *cpk28* beobachtete Phänotyp entspricht allerdings nicht komplett der Beschreibung der *NST1*- oder *NST3*-Überexpressionslinien, für die nicht über einen Defekt in der Sprosselongation berichtet wird (Mitsuda *et al.* 2005, Zhong *et al.* 2006, Mitsuda *et al.* 2007). Ektopische Ausbildung von sekundärer Zellwand in

parenchymatischen Geweben in *35S::NST3* führte zwar zu reduzierter Größe vieler Organe und Deformationen wie eingerollten Blättern, die Elongation des Sprosses dieser Pflanzen war offensichtlich aber nicht gestört (Zhong *et al.* 2006). In laboreigenen Versuchen mit selbst generierten transgenen *Arabidopsis*-Linien führte Überexpression von *NST1* (*35S::NST1-YFP*) auch nicht zu reduzierter Sprosselongation, sondern zu einem Sterilitätsphänotyp (Daten nicht gezeigt), vielleicht aufgrund einer Veränderung der Antherenentwicklung durch ektopische *NST*-Expression. Der Unterschied dieser Linien zu *cpk28* könnte darin begründet sein, dass hier nur jeweils ein *NST*-Protein stark exprimiert wird, während in *cpk28* beide Transkriptionsfaktoren simultan erhöhte Expression zeigen. Andererseits könnte die molekulare Funktion der CPK28 eben nicht die direkte Repression dieser Aktivatoren des sekundären Dickenwachstums sein, sondern in einem übergeordneten Mechanismus andere Prozesse beeinflussen, womit die Erhöhung der *NST*-Expression nur einen indirekten Effekt des CPK28-Verlusts darstellen würde.

Die verminderte Sprosselongation der *cpk28*-Mutanten könnte durch das Unvermögen der vorzeitig lignifizierten Gewebe zur Zellelongation hervorgerufen werden. Andererseits wird jedoch auch diskutiert, dass ektopische Lignifizierung erst aufgrund von mangelnder Zellproliferation und/oder -elongation entsteht und damit den sekundären Effekt eines Zellentwicklungsdefekts darstellt (Sanchez-Rodriguez *et al.* 2010). Denkbar wäre auch ein Wachstumsstopp des Sprosses durch Limitierung des Wassertransportes und/oder Instabilität des Pflanzenkörpers durch unterentwickelte Xylemfasern (Bonawitz und Chapple 2010). Reduzierte Lignifizierung der Xylemfasern, wie für *cpk28* beobachtet, muss alleine jedoch nicht zwangsläufig eine Reduktion des Sprosswachstums bewirken. Sie resultierte im Fall der *NST3*-Überexpression beispielsweise in langen, aber instabilen Sprossen, die das zunehmende Gewicht der sich bildenden Blütenorgane und Schoten nicht mehr trugen und umknickten (Zhong *et al.* 2006).

In einer Transkriptionsanalyse, bei der sekundäres Dickenwachstum spezifisch durch Gewicht induziert wurde, stammten zwölf Prozent der differenziell regulierten Gene aus dem Bereich der Signaltransduktion. Darunter konnte erhöhte Expression von *CPK28* spezifisch beim Übergang von primärem zu sekundärem Wachstum beobachtet werden (Ko *et al.* 2004). Dies untermauert die Bedeutung von CPK28 als Signaltransduktionskomponente in der Koordination des sekundären Wachstums.

4.3. Zusammenhang zwischen CPK28 und dem Hormonhaushalt in *A. thaliana*

Die Charakterisierung der *cpk28*-T-DNA-Insertionslinien zeigte eine Funktion der calcium-abhängigen Proteinkinase CPK28 in der hormonellen Regulation der Pflanze auf. Funktionsverlust der CPK28 führte zu vielfältigen Wachstumsstörungen, deren Merkmale

im Folgenden als GA-Defizienzerscheinungen und auch JA-Akkumulationsausprägungen diskutiert werden.

4.3.1. Die Funktion der CPK28 im Gibberellinsäuremetabolismus

Für *cpk28* konnten Defekte der Sprosselongation sowie der Blattmorphologie beobachtet werden. Dieser Phänotyp trat spezifisch in der reproduktiven Phase des Wachstums auf (Abb. 3-6, 3-7), und konnte partiell durch externe Applikation von GA komplementiert werden (Abb. 3-28). Dies und die entwicklungsspezifische Reduktion der GA-Markergene *GA20-Oxidase1* (*GA20ox1*) und *GA3-Oxidase1* (*GA3ox1*) (Abb. 3-28, 3-29), der letzten beiden Schritte der Biosynthese bioaktiven Gibberellins GA_4 (Abb. 1-7), liefern Hinweise auf eine stadienspezifische Störung des GA-Metabolismus.

Direkte Messung des GA-Gehalts von *cpk28* wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des sehr aufwändigen und weltweit nur in wenigen Laboren etablierten Messprozederes nicht durchgeführt. Aus diesem Grund wurde auf die indirekte Untersuchung des GA-Metabolismus' mittels Markergenexpressionsanalyse zurückgegriffen. Schlüsselenzyme des GA-Biosynthesewegs sind durch Rückkopplungsmechanismen reguliert, weshalb ihr Expressionsniveau einen indirekten Maßstab für den tatsächlichen Hormongehalt der Pflanze darstellt (Yamaguchi 2008). Nachdem in *cpk28* die entwicklungsspezifische Deregulation der GA-Biosynthesegene *GA20ox1* und *GA3ox1* detektiert werden konnte (Abb. 3-28, 3-29), wird von einer Reduktion des GA-Gehalts zu diesen Zeitpunkten ausgegangen. Viele Mutanten mit reduziertem Gibberellingehalt weisen Zwergwachstum auf und ihre phänotypischen Charakteristika können durch externe Gabe von GA revertiert werden (Koorneef und Vanderveen 1980, Sun und Gubler 2004). Zwergwüchsige Mutanten mit Defekten in Komponenten der Signaltransduktion wie beispielsweise den GA-Rezeptoren (*gid1 gid2 gid3*) (Griffiths *et al.* 2006) oder auch mit GA-insensitiven, konstitutiv-aktiven DELLA-Repressoren (Dill und Sun 2001) zeigten keine Reversion des Phänotyps bei externer GA-Gabe. Komplementation des *cpk28*-Phänotyps durch exogenes GA könnte also eher auf Störung der Biosyntheseregulation als auf einen Defekt in der Signaltransduktion hinweisen. Interessanterweise ist die Sprosselongation nur insofern GA-abhängig, solange die DELLA-Repressoren GAI und RGA in funktionaler Form vorliegen. *ga1-3*-Mutanten mit einem Defekt in einem essentiellen Schritt der Biosynthese zeigten nicht die übliche Wachstumsretardation, wenn die Funktion beider DELLA-Proteine RGA und GAI inhibiert war (King *et al.* 2001). CDPKs werden schon seit geraumer Zeit als Regulatoren diverser hormongesteuerter Prozesse in Pflanzen diskutiert (Harper und Harmon 2005). Neben transkriptioneller Induktion von CDPKs durch Gibberellinsäure (Yang *et al.* 2003) konnte auch eine GA-abhängige Steigerung der Kinaseaktivität beobachtet werden (Abbasi *et al.* 2004). In

Tabak wurde *NtCDPK1* als negativer Regulator der GA-Homöostase identifiziert. *NtCDPK1* phosphoryliert einen transkriptionellen Aktivator der GA-Biosynthese, RSG, *in vivo* und führt damit zu dessen 14-3-3-vermittelter Inaktivierung und somit Repression der GA-Biosynthese (Ishida *et al.* 2008). Im Vergleich hierzu konnte durch CPK28 eine neue Funktion für CDPKs in der GA-Homöostase identifiziert werden. Die aktive calcium-abhängige Kinase übt in diesem Fall einen positiven Effekt auf den GA-Metabolismus aus, Funktionsverlust führt offensichtlich zu reduzierter GA-Biosynthese. Zukünftig muss geklärt werden, ob CPK28 diesen Einfluss durch direkte Interaktion bzw. Aktivierung von Komponenten der GA-Biosynthese bewirkt oder ob Funktionsverlust der CPK28 indirekt, durch der Kinaseaktivität nachfolgende Effekte, den vermuteten GA-Mangel in der Pflanze auslöst. Die Tatsache, dass exogene GA-Behandlung den *cpk28*-Phänotyp nur teilweise revertiert (Abb. 3-26), könnte einerseits dafür sprechen, dass dieser GA-abhängige Prozess nur einen Teil der CPK28-vermittelten Antworten darstellt und andere, nicht durch GA-beeinflussbare, CPK28-abhängige Signalkaskaden weiterhin reprimiert sind. Andererseits wäre die unvollständige Reversion auch dadurch erklärbar, dass durch exogene GA-Applikation der tatsächliche *in planta*-Status des Hormons bezüglich Konzentration und/oder räumlicher bzw. zeitlicher Verteilung nicht erreicht werden kann. Im Gegensatz zu *cpk28* ist die Wachstumssuppression vieler Mutanten im GA-Metabolismus meist nicht auf eine spezifische Wachstumsphase beschränkt. GA ist neben vielfältigen Entwicklungsprozessen während der kompletten Pflanzenentwicklung eben auch für Blühinduktion oder Sprosselongation verantwortlich (Richards *et al.* 2001). Nachdem jedoch die Blühinduktion und auch andere GA-vermittelte Prozesse wie Keimung oder Hypocotylelongation nicht durch die CPK28-Funktion beeinflusst werden (Abb. 3-6, 3-30), scheint CPK28 nur an einer Teilmenge der entwicklungspezifischen GA-Signaltransduktionsereignisse teilzunehmen. Dies könnte durch gewebespezifische Expression der Kinase, Verfügbarkeit von vorgeschalteten Aktivatoren (wie z. B. Calcium-Stimuli) oder die Verfügbarkeit oder Zugänglichkeit der *in vivo*-Substrate reguliert sein. Es würde also eine spezifische Regulation nur eines klar definierten GA-abhängigen Prozesses, nämlich der Sprosselongation, initiiert werden. Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass Blühinduktion und Sprosselongation GA-induzierte Prozesse während der Etablierung der reproduktiven Phase darstellen, jedoch von unterschiedlichen GA-Spezies in unabhängigen Prozessen reguliert werden (Evans 1999). Dies wird von Studien unterstützt, die je nach Wachstumsbedingungen keine zeitliche Abhängigkeit für Blühinduktion und Internodienelongation nachweisen können und damit zwei unabhängig regulierte Prozesse zu Beginn der reproduktiven Phase beschreiben (Pouteau und Albertini 2009).

Merkmale des *cpk28*-Phänotyps wie deformierte Blätter oder Deregulation der Apikaldominanz (Abb. 3-7, 3-23) könnten als sekundäre Effekte der mutmaßlichen Beeinträchtigung des GA-Metabolismus erklärt werden. Störung der präzisen Lokalisation von bioaktivem GA resultierte in der Ausbildung genau dieser phänotypischen Defekte in Pappel (Mauriat *et al.* 2011). Auch stadienspezifische Anthocyanakkumulation in *cpk28* (Abb. 3-8) könnte eine weitere GA-Mangelercheinung sein. Gibberellin konnte neben anderen Phytohormonen die saccharose-induzierte Anthocyanakkumulation im Wildtyp reprimieren (Loreti *et al.* 2008). Entsprechend wurde in gaschromatographischen Analysen der *cpk28*-Mutanten erhöhter Zuckergehalt, unter anderem Saccharose, in phänotyp-aufweisenden Mutanten detektiert, wenn auch Reduktion der GA-Synthesegene und Anthocyanakkumulation beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt). Sowohl Saccharoseakkumulation als auch GA-Defizienz könnten damit zu erhöhtem Anthocyanengehalt in *cpk28* beitragen. Auch die für *cpk28* beobachtete Reduktion der Blütenanzahl pro Infloreszenz (Abb. 3-9) könnte ein weiterer Effekt des reduzierten GA-Gehalts sein. Der GA-Gehalt in Pflanzen beeinflusst die Blütenanzahl, Funktionsverlust von Enzymen des GA-Metabolismus, GA20-Oxidasen und auch GA2-Oxidasen zeigten neben reduziertem GA-Gehalt auch Defekte in der Anzahl der Blüten (Rieu *et al.* 2008a, Rieu *et al.* 2008b).

4.3.2. Der Zusammenhang von GA und CPK28 in der vaskulären Entwicklung

Der Einfluss von Phytohormonen auf die vaskuläre Entwicklung ist allseits bekannt und gut untersucht (Elo *et al.* 2009). *cpk28*-Mutanten weisen Defekte in der vaskulären Entwicklung auf, neben vorzeitiger Lignifizierung der Phloemfasern hauptsächlich charakterisiert durch reduzierte Lignifizierung trachealer Xylemelemente (Abb. 3-10). Lange Zeit wurde GA nicht als essentielle Komponente in der Regulation der kambialen Aktivität und damit der vaskulären Entwicklung angesehen. Allerdings konnte in gewebespezifischen Lokalisationsstudien ein GA-Konzentrationsmaximum in sich differenzierenden Xylemzellen beobachtet werden (Israelsson *et al.* 2005). Die essentielle Bedeutung dieser speziellen Verteilung von GA innerhalb der Vaskulatur für die normale Xylementwicklung wurde gezeigt, Störung der GA-Konzentration führte zu Defekten in der Xylembildung (Mauriat *et al.* 2011). GA wurde eine Rolle sowohl in der Induktion der vaskulären Entwicklung als auch der Differenzierung, Expansion und Elongation von Xylemfaserzellen in Spezies wie *Arabidopsis*, Tabak oder Pappel zugewiesen (Mauriat und Moritz 2009, Ragni *et al.* 2011, Dayan *et al.* 2012). Diese Erkenntnisse könnten insofern also nicht nur den Sprosselongationsphänotyp, sondern auch den Defekt der Xylementwicklung durch mutmaßlichen GA-Mangel in *cpk28* erklären. Hierfür könnte vielleicht eine Störung der korrekten GA-Lokalisation innerhalb des Gewebes

verantwortlich sein, gerade wenn man die gewebespezifische Lokalisation der *CPK28*-Expression im Xylem bedenkt (Abb. 3-14). Das Blühen der Pflanze wurde als essentielle Grundlage des sekundären Wachstums im Hypocotyl beobachtet (Sibout *et al.* 2008). Nachdem der Spross in Rosettenpflanzen erst durch den Übergang ins reproduktive Wachstum entsteht, ist dies ebenso für das sekundäre Dickenwachstum des Sprosses Voraussetzung. Der beobachtete Effekt von *CPK28* auf das sekundäre Sprossdickenwachstum kann also erst nach der Blühinduktion zum Tragen kommen. Hier wären Untersuchungen zum Einfluss von *CPK28* auf die Entwicklung des sekundären Dickenwachstums im Hypocotyl interessant, welches schon vor der Blühinduktion analysiert werden kann.

Durch externe GA-Applikation konnte der Elongationsphänotyp der *cpk28*-Mutanten teilweise revertiert werden, allerdings hatte dies keinen Einfluss auf die vorzeitige Lignifizierung oder die Defekte in der Xylementwicklung (Abb. 3-32). Übereinstimmend konnte auch keine Reduktion der erhöhten Genexpression von *NST1* und *NST3* nach GA-Behandlung in *cpk28* beobachtet werden, wie auch der Wildtyp zeigte *cpk28* weitere Transkriptakkumulation der Aktivoren des sekundären Dickenwachstums nach GA-Applikation (Abb. 3-31). Bisher wurde noch kein direkter Zusammenhang zwischen dem Hormonhaushalt der Pflanzen und der NST-abhängigen Regulation des sekundären Dickenwachstums beschrieben. Auch die hier erhaltenen Daten deuten auf zwei unabhängige Entwicklungsprozesse hin, die von *CPK28* ohne direkten funktionalen Zusammenhang reguliert werden.

4.3.3. Die Bedeutung von *CPK28* im Jasmonat-Haushalt

Kurz vor Ende der Bearbeitungszeit dieser Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen CDPKs und der Regulation des JA-Haushalts in *Nicotiana attenuata* beschrieben (Yang *et al.* 2012a). Bei simultaner Repression der *NaCDPK4*- und *NaCDPK5*-Expression mittels RNA-Interferenz (*IRcdpk4/5*) konnte deutliche Akkumulation von JA und JA-induzierter Sekundärmetabolite mit daraus resultierender, verbesserter Resistenz gegen Herbivore gezeigt werden (Yang *et al.* 2012a). Die Pflanzen wiesen einen von der Funktionalität der JA-Signaltransduktion abhängigen Phänotyp mit reduzierter Sprosshöhe und vermindertem Rosettendurchmesser auf (Yang *et al.* 2012a, Heinrich *et al.* 2013). Da die beiden orthologen *NaCDPKs* aufgrund ihrer Sequenz ebenso wie *CPK28* in Subgruppe IV des *Arabidopsis*-CPK-Stammbaums eingeordnet werden (Stammbaum bei Boudsocq und Sheen (2013)), besteht die Möglichkeit der Homologie und damit funktionellen Übereinstimmung dieser Proteine. Deshalb ist die Untersuchung der *CPK28*-Funktion im JA-Haushalt in *A. thaliana* notwendig und erste Ergebnisse werden im Rahmen dieser Arbeit beschrieben.

Genexpressionsanalysen und Kreuzungsexperimente von *cpk28* mit Mutanten des JA-Haushalts deuten tatsächlich auf Homologie der erwähnten CDPKs hin. In *cpk28* konnte, wie für viele ihrer Funktionsverlust-Merkmale ebenfalls entwicklungsabhängig, erhöhte Expression von JA-induzierten Markergenen wie *PDF1.2*, *COR13* oder *VSP2* sowie auch der JA-Signaltransduktionskomponenten *JAZ1* und *JAZ10* beobachtet werden (Abb. 3-33, 3-34). Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus *Nicotiana attenuata*, die sich auf Expressionsanalysen der Biosynthesegene beschränken, konnte auch in *cpk28* keine gesteigerte Expression von Biosynthesegenen beobachtet werden (Abb. 3-34) (Yang *et al.* 2012a), obwohl in *Nicotiana attenuata* erhöhter JA-Gehalt ohne und auch nach Verwundung bzw. Raupenfraß gemessen wurde. Kreuzung von *cpk28* mit *aos* (JA-Biosynthese-Defekt) bzw. *coi1-16* (JA-Signaltransduktions-Defekt) führte zur Reversion des *cpk28*-Sprosselongationsphänotyps (Abb. 3-36), wie auch der *IRcdpk4/5*-Phänotyp in *Nicotiana attenuata* durch simultane Repression des JA-Rezeptors *NaCO11* revertiert werden konnte (Yang *et al.* 2012a). Eine detaillierte Analyse der generierten *cpk28*-Doppelmutanten steht noch aus, dieses erste Ergebnis spricht jedoch für JA-Akkumulation oder erhöhte JA-Signaltransduktion in *cpk28* und deren Ursächlichkeit für das Auftreten des Sprosselongationsphänotyps. Die sich deckenden Beobachtungen für die verschiedenen Spezies sprechen für eine gleiche oder ähnliche Funktion von *AtCPK28* zu *NaCDPK4* bzw. *NaCDPK5* in der Repression der JA-Akkumulation, wobei in *Nicotiana attenuata* funktionelle Redundanz der beiden orthologen CDPKs gezeigt wurde (Yang *et al.* 2012a), während in *Arabidopsis* nur ein Protein, nämlich CPK28, diese Funktion übernimmt.

Viele der für *cpk28* beobachteten phänotypischen Merkmale stimmen mit der Beschreibung dauerhaft JA-akkumulierender Mutanten überein. Hierzu zählen reduzierte Sprosselongation, verminderter Rosettendurchmesser, deformierte Blätter und Anthocyanakkumulation (Ellis und Turner 2001, Xu *et al.* 2001, Turner *et al.* 2002, Caño-Delgado *et al.* 2003, Bonaventure *et al.* 2007, Hyun *et al.* 2008, Yang *et al.* 2012a), was die Theorie der JA-Akkumulation in *cpk28* unterstützt. Auch der für *cpk28* beobachtete Defekt in der Meristementwicklung und die damit reduzierte Blütenzahl (Abb. 3-9) könnte als Effekt erhöhten JA-Gehalts erklärt werden. Durch Repression der *NaCDPK4/5*-Expression wurde ebenso eine Deregulation der meristematischen Proliferation beobachtet (Yang *et al.* 2012a), möglicherweise durch JA-induzierte Mitosesuppression, die für wachstumsunterdrückte Pflanzen mit JA-Akkumulation nach wiederholter Verwundung beobachtet wurde (Zhang und Turner 2008). Ein weiteres Merkmal JA-akkumulierender Mutanten ist JA-vermittelte, erhöhte Resistenz gegenüber nekrotrophen Mikroorganismen oder Fraßinsekten (Ellis *et al.* 2002b, Yang *et al.* 2012a). Erste durchgeführte Fraß-Experimente mit Raupen des Nachtfalters *Trichoplusia ni* konnten

keine Unterschiede im Fressverhalten der Raupen zwischen Wildtyp und *cpk28* zeigen (Daten nicht gezeigt). Deshalb sind weitere Untersuchungen zur JA-Akkumulation sowohl im biologischen System, neben Fraßinsekten alternativ auch in Wachstumsstudien nekrotropher Pilze, als auch direkte Messungen des JA-Gehalts mittels HPLC als nächste Schritte notwendig.

JA-Akkumulation wird unter anderem in Mutanten mit Defekten in der primären oder sekundären Zellwandbiosynthese beobachtet. So stellt beispielsweise *constitutive expression of VSP1 (cev1)*, auch *ectopic lignin1 (eli1)* genannt, eine Funktionsverlustmutante der Cellulose-Synthase3 dar, deren Wachstumsphänotyp vom Auftreten ektopischer Lignifizierung begleitet wird (Ellis *et al.* 2002a, Caño-Delgado *et al.* 2003), was auch in *cpk28* beobachtet wurde (Abb. 3-10, 3-11). Für *cpk28* konnten in einer photometrischen Bestimmung des Cellulosegehalts unterschiedlicher Gewebetypen (Blatt, Petiole, Spross) nach Updegraff (Updegraff 1960) keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), wobei diese Methode mittels photometrischer Bestimmung nur grobe Quantifizierung liefert und beispielsweise massenspektrometrische Methoden wie GCMS-Analysen mit der Möglichkeit der Unterscheidung verschiedener Zellwandpolymere komplexere Analysen zulassen würden. Für JA wurde auch eine Funktion in der Regulation des sekundären Dickenwachstums beschrieben (Sehr *et al.* 2010). Die Signaltransduktionskomponenten JAZ1, JAZ10, JAZ7, MYC2 und COI1 und auch JA selbst konnten als regulatorische Faktoren der Kambiuminitiation bzw. -aktivität beobachtet werden. Außerdem entwickelten JA-behandelte Pflanzen Zellwandverdickung im Xylem und lignifizierte Phloemfasern im Spross (Sehr *et al.* 2010). Dies entspricht nicht den anatomischen Beobachtungen für *cpk28*, denn neben induzierter Phloemfaser-Lignifizierung ist hier die Xylementwicklung reduziert. Defekte in der Xylementwicklung konnten jedoch neben ektopischer Lignifizierung für die JA-akkumulierende Mutante *eli1* (oder *cev1*) beobachtet werden (Caño-Delgado *et al.* 2000), was erhöhten JA-Gehalt auch als Ursache für die *cpk28*-spezifischen anatomischen Merkmale möglich erscheinen lässt. JA-Behandlung und konstitutiv-erhöhter JA-Gehalt in Funktionsverlustmutanten können also unterschiedliche Auswirkung zeigen.

Der Einfluss von Calcium als Signaltransduktion-Komponente für die JA-Regulation wird diskutiert, da Verwundung und auch Herbivorfraß einen Anstieg der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration hervorrufen (Maffei *et al.* 2004). Die CDPKs *NaCDPK4* und *NaCDPK5* sind in der JA-Akkumulation involviert (Yang *et al.* 2012a), *AtCPK3* und *AtCPK6* sind an der Regulation der transkriptionellen Veränderung nach Insektenfraß beteiligt (Kanchiswamy *et al.* 2010) und *AtCPK6* reguliert die Methyl-Jasmonat-Signaltransduktion in Stomata (Munemasa *et al.* 2011).

Die Mutante *fatty acid oxygenation upregulated2 (fou2)* aus *Arabidopsis*, die eine *gain-of-function*-Variante des calcium-durchlässigen Kanals TPC1 der Vakuole exprimiert, zeigt ähnlich wie *cpk28* stadienspezifische Wachstumssuppression, die als Folge der beobachteten JA-Akkumulation diskutiert wird (Bonaventure *et al.* 2007). Ein Defekt der Sprosselongation in diesen Pflanzen wird nicht beschrieben, allerdings wurde wie bei *cpk28* ein entwicklungsabhängiger Phänotyp mit deformierten Blättern, verkürzten Petiolen und Anthocyanakkumulation ca. ab Tag 28 beobachtet. Anders als im Fall von *cpk28* konnte dieser jedoch nur teilweise durch Kreuzung mit *coi1-1* revertiert werden konnte (Bonaventure *et al.* 2007). Charakterisierung der Eigenschaften des übermäßig aktiven TPC1-Kanals mittels Aktivitätsmessungen lassen verstärkte cytosolische Calcium-Stimuli durch Veränderung des vakuolären Membranpotentials als Ursache der JA-Akkumulation vermuten (Beyhl *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu zeigen *loss-of-function-tpc1*-Mutanten einen ABA-abhängigen Keimungs- und Stomataöffnungsdefekt (Peiter *et al.* 2005). Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit von *fou2* und *cpk28* könnte man sich einen funktionalen Zusammenhang zwischen TPC1-Aktivierung und CPK28 vorstellen, vielleicht durch veränderte cytosolische Calcium-Stimuli in *fou2* und daraus resultierender veränderter Aktivierung der CPK28. Diese Verbindung wird momentan durch die Analyse von *cpk28-tpc1*-Doppelmutanten untersucht, konnte jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen werden.

4.3.4. CPK28 und PP2C – Regulatoren der JA-Signaltransduktion?

Für CPK28 und den im Hefe-System identifizierten putativen Interaktor PP2C (AP2C4) konnte in weiterführenden Experimenten eine *in vivo*-BiFC-Interaktion und auch *in vitro*-Interaktion im *pulldown*-Experiment bestätigt werden (Abb. 3-43, 3-44). Hauptsächlich kernlokalisierte Expression von PP2C in der BiFC-Analyse wurde unterbunden, sobald CPK28 koexprimiert war, und eine spezifische Interaktion von CPK28 und PP2C an der Plasmamembran konnte detektiert werden. Für CDPKs sind stressabhängige Relokalisierungen von der Plasmamembran in den Nucleus bekannt (Patharkar *et al.* 2000) und auch für Phosphatasen wurden Lokalisierungsveränderungen mit oder ohne Stimulus beobachtet, beispielsweise für die in der ABA-abhängigen Signaltransduktion charakterisierte PP2C-Phosphatase ABA-INSENSITIVE1 (ABI1) (Zhang *et al.* 2004). Leider konnte in weiteren biochemischen Analysen kein Aufschluss über die molekulare Auswirkung der Interaktion, über mutmaßliche (De-)Phosphorylierung des jeweils anderen Partners erzielt werden. CPK28 war *in vitro* nicht in der Lage, rekombinantes PP2C-GST-Protein zu phosphorylieren, und auch eventuelle CPK28-Dephosphorylierung durch PP2C *in vitro* konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies mag aufgrund der wenigen durchgeführten Versuche jedoch technischen Problemen geschuldet sein, es

wurde in dieser Arbeit kein Schwerpunkt auf die Versuchsetablierung zum Nachweis dieser Modifikationen gelegt. Hierzu wären unter Umständen sehr spezielle Analysen wie beispielsweise die Kenntnis der PP2C-beeinflussten Phosphorylierungsstellen an CPK28 nötig, was jedoch in diesem Rahmen nicht detailliert untersucht wurde.

Ein Versuch der funktionalen Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen der PP2C und CPK28 wurde durch Analysen von T-DNA-Insertionslinien (*pp2c*) bzw. PP2C-Überexpressionslinien (*35S::PP2C-YFP*) unternommen. PP2C-Funktionsverlustmutanten wiesen in den hier durchgeführten Analysen Wildtypaussehen auf (Abb. 3-46). Entgegen der Beobachtungen von Umbrasaite *et al.* (2010) konnte in den für die vorliegende Arbeit generierten *35S::PP2C-YFP*-Linien ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden, wie von den Autoren explizit nur für die ektopische Expression der nah-verwandten PP2C AP2C3 beschrieben. Diese resultierte in einem Zellproliferationsdefekt mit Überproduktion von Stomata und reduziertem Wachstum (Umbrasaite *et al.* 2010). In *35S::PP2C-YFP* konnte ebenso Zwergwachstum festgestellt werden, während die höchste PP2C-YFP-Proteinkonzentration in den Stomata beobachtet wurde, mutmaßlich mit vermehrter Bildung von Stomata (keine quantitative Auswertung) (Abb. 3-45, 3-46). Ein genauer Vergleich des AP2C3-*gain-of-function*-Phänotyps mit den für *35S::PP2C-YFP* beobachteten Merkmalen wurde nicht angestellt, allerdings scheint eine redundante Funktion der PP2C und der AP2C3 durchaus möglich. Für beide Phosphatasen wurde *in vitro*-Dephosphorylierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 und *in vivo*-Interaktion mit diesen MPKs mittels BiFC gezeigt (Umbrasaite *et al.* 2010).

Genexpressionsanalysen der untersuchten *Arabidopsis*-Linien wiesen wie erwartet einerseits reduziertes (*pp2c*), andererseits erhöhtes (*35S::PP2C-YFP*) PP2C-Transkript auf (Abb. 3-47). In CPK28-Funktionsverlust- und Überexpressions-Linien konnten keine Unterschiede in der PP2C-Expression detektiert werden, wie auch die CPK28-Transkriptmenge in *pp2c* und *35S::PP2C-YFP* mit dem Wildtyp vergleichbar war. Dies wurde auch nicht unbedingt erwartet, da selbst im Fall einer Interaktion die direkte (De-)Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation nicht zwangsläufig Einfluss auf die Expressionsstärke der jeweiligen Partner haben muss. Für CPK28-beeinflusste Markergene des sekundären Dickenwachstums (*NST1*, *NST3*) und des GA-Metabolismus (*GA3ox1*) konnten in *pp2c* oder *35S::PP2C-YFP* keine Abweichungen von der Wildtyp-Transkriptmenge festgestellt werden (Abb. 3-47). Funktionsverlust- oder Gewinn der PP2C führte also nicht zu einer ähnlichen Deregulation der Genexpression wie in *cpk28* beobachtet. Nachdem *pp2c* und *35S::PP2C-YFP* auch keine Phänokopie des *cpk28*-Phänotyps darstellten (Abb. 3-45), kann vermutlich nicht von einer CPK28-PP2C-Interaktion als klassisches Kinase-Phosphatase-Paar ausgegangen werden. Bei direkter, vollständiger Aktivierung oder Inaktivierung eines Partners (oder der Reversion

dessen Funktion) durch das jeweils andere Enzym sollte entweder der Verlust oder aber die Überexpression der *PP2C* zu den gleichen zellulären Auswirkungen und damit zum gleichen Phänotyp führen wie der CPK28-Funktionsverlust. Deshalb bleibt die Frage nach dem direkten funktionalen Zusammenhang zwischen CPK28 und PP2C ungeklärt.

Während auch die Genexpression der JA-Antwort in *pp2c* nicht beeinflusst war, konnte jedoch Repression der untersuchten Gene *PDF1.2*, *JAZ1*, und *JAZ10* in *35S::PP2C-YFP* festgestellt werden (Abb. 3-47). Dies könnte durch einen direkten, negativen Einfluss der PP2C auf die Aktivität der interagierenden MPK3 bzw. MPK6 erklärt werden, welche unter anderem wichtige Faktoren in der Signaltransduktion JA-abhängiger Abwehrprozesse sind. *mpk3* und *mpk6* weisen wie *35S::PP2C-YFP* reduzierte JA-Markergenexpression auf (Takahashi *et al.* 2007). Da CPK28-Funktionsverlust erhöhte JA-abhängige Genexpression bewirkt (Abb. 3-34), wäre bei verstärkter CPK28-Aktivität eigentlich eine Repression derselben zu erwarten, vielleicht ähnlich der PP2C-Überexpression. Dies kann in *35S::CPK28-YFP* jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3-34.), könnte aber in der bereits diskutierten posttranslationalen Aktivitätsregulation der CPK28 in diesen Linien (4.2.4.) begründet sein. Eine Verbindung der CPK28 mit MAP-Kinase-Signalkaskaden wurde bisher nicht untersucht. Jedoch wurde ein Einfluss der mutmaßlichen CPK28-Homologe *NaCDPK4/5* in Tabak auf die MAP-Kinase-vermittelte JA-Signaltransduktion beobachtet. Repression der *NaCDPK4/5*-Expression führte nach Verwundung zu gesteigerter Aktivität der Tabak-MAP-Kinase SA-INDUCED PROTEIN KINASE (SIPK), was als Erklärung der JA-Akkumulation in diesen Pflanzen diskutiert wird (Yang *et al.* 2012a). Die Untersuchung der MAP-Kinasen-Aktivierung in *cpk28* wäre also durchaus interessant.

Nachdem die hier isolierte PP2C auch im Kontext einer Protein-Interaktionsdaten-Studie zur Identifizierung neuer Proteine der Zellwandsynthese genannt wurde (Zhou *et al.* 2010), erscheint in Anbetracht der bereits diskutierten Funktion der CPK28 als Repressor der JA-Signaltransduktion *in vivo*-Interaktion zwischen PP2C und CPK28 vielleicht doch möglich. Es wäre denkbar, dass PP2C und CPK28 im Zusammenspiel, vielleicht über regulatorische Mechanismen an MPK3 und MPK6, die JA-abhängige Signaltransduktion reprimieren. Direkte funktions-(in-)aktivierende Interaktion des Kinase-Phosphatase-Paars konnte in den unternommenen Analysen jedoch nicht gezeigt werden, weshalb das genaue Zusammenspiel dieser beiden Enzyme zu klären bleibt.

4.3.5. CPK28 in der GA-JA-Balance

Übereinstimmend und fast zeitgleich mit der aus dieser Arbeit resultierenden Veröffentlichung über CPK28 in *Arabidopsis* (Matschi *et al.* 2013) wurde auch für *IRcdpk4/5* aus *Nicotiana attenuata* eine Reduktion des GA-Gehalts, verminderte

Expression von GA-Biosynthese-Genen und die Reversion des Sprosselongationsphänotyps durch Behandlung mit exogenem GA publiziert (Heinrich *et al.* 2013). Dies liefert einen weiteren Hinweis auf Homologie dieser Proteine. Bekanntermaßen stellen JA und GA Gegenspieler in der pflanzlichen Balance zwischen Induktion von Wachstum oder Abwehrmechanismen dar, deren Menge und damit verbundene Veränderungen in Genexpression und metabolischem Profil je nach Wachstumsbedingungen entweder in die eine oder andere Richtung präferiert werden (Kazan und Manners 2012). Diese antagonistische Wirkung wird unter anderem durch direkte Interaktion der GA-regulierenden DELLA-Proteine und JA-abhängigen JAZ-Faktoren vermittelt (Hou *et al.* 2010, Wild *et al.* 2012, Yang *et al.* 2012b).

Für *cpk28* als mutmaßlich JA-akkumulierende und GA-defiziente Mutante stellt sich nun die Frage nach dem Ursprung dieser Deregulation. Führen unbekannte Mechanismen wie beispielsweise Modifikation der Zellwand zu CPK28-abhängiger JA-Akkumulation, die nachfolgend GA-Biosynthese und damit GA-induzierte Prozesse unterdrückt (Yang *et al.* 2012b)? Oder werden zuerst, durch direkte oder indirekte CPK28-vermittelte Mechanismen, GA-Biosynthese und Signaltransduktion reprimiert, was zu vermehrter DELLA-JAZ-Bindung führt und ohne die JAZ-reprimierende Wirkung dann JA-Synthese und Signaltransduktion initiiert (Hou *et al.* 2010)? Kann CPK28 direkt in die JAZ-DELLA-vermittelte Regulation dieses Hormongleichgewichts eingreifen und sichert somit die Balance zwischen Wachstums- und Abwehrmechanismen?

GA-Behandlung des Wildtyps in dieser Arbeit bewirkte kaum Veränderung der JA-abhängigen Genexpression. Hohe Expression der JA-Markergene in *cpk28* wurde durch GA-Behandlung zwar reduziert, blieb im Vergleich zum Wildtyp jedoch signifikant erhöht (Abb. 3-35). Der GA-Gehalt hat hier also einen Einfluss auf JA-abhängige Genexpression. Die GA-Biosynthese-Mutante *ga1-3* zeigte unbehandelt keine erhöhte JA-Markergenexpression, was jedoch durch JA-Behandlung induziert werden konnte und bei gleichzeitiger GA-Behandlung teilweise reprimiert wurde (Hou *et al.* 2010). Genetisch bedingte GA-Defizienz bedingt also nicht zwangsläufig erhöhte JA-Markergenexpression, niedriger GA-Gehalt in *cpk28* durch mangelnde GA-Biosynthese muss also nicht zur konstitutiven Stimulation des JA-Signalwegs führen. Im Gegensatz dazu zeigen konstitutiv JA-akkumulierende Mutanten auch ohne JA-Behandlung reprimierte GA-Biosynthese (Abb. 3-28, 3-29) (Heinrich *et al.* 2013), und JA-Behandlung im Wildtyp führte zu einer Akkumulation von DELLA-Proteinen, welche weiterführend GA-Signaltransduktion unterdrücken (Yang *et al.* 2012b). Dies unterstützt die Theorie, dass JA-Akkumulation den Ursprung der Hormonderegulation in *cpk28* initiieren könnte und nachfolgend GA-Defizienz verursacht.

Die Genexpression der JAZ-Faktoren *JAZ1* und *JAZ10* ist in *cpk28*-Mutanten erhöht (Abb. 3-34), was eigentlich für eine verstärkte Repression des JA-Signalwegs, vermehrte DELLA-Interaktion und damit Aufhebung der Repression der GA-Signaltransduktion sprechen würde. Die Expression von JAZ-Faktoren wird aber durch JA-Akkumulation gesteigert, möglicherweise um in einer Rückkopplungsreaktion durch JAZ-vermittelte JA-Inhibition übermäßige JA-Signaltransduktion zu vermeiden (Chini *et al.* 2007, Thines *et al.* 2007). Dies würde erhöhte JAZ-Expression durch mutmaßlich hohen JA-Gehalt in *cpk28* erklären. Wieso allerdings hohe JAZ-Level nicht durch erhöhte DELLA-Interaktion und nachfolgende Aufhebung der GA-Repression zu einer gesteigerten Wachstumsantwort in *cpk28* führen, bleibt zu klären. Ohne die regulierende Funktion der CPK28 scheint die JA-GA-Balance auf Seiten der JA-Signaltransduktion zu liegen, vielleicht durch Defekte in der JAZ-DELLA-Interaktion oder DELLA-Degradation und damit konstitutiver Repression der GA-Signaltransduktion in *cpk28*. Pflanzen mit konstitutiv-aktiven DELLA-Repressoren wiesen, wie *cpk28*, erhöhte JA-abhängige Genexpression ohne Stimulus auf (Navarro *et al.* 2008). Gesteigerte JA-Signaltransduktion in *cpk28* könnte also durch verstärkte DELLA-Stabilität in der Mutante erklärt werden. In diesem Zusammenhang ist die Aufklärung der regulatorischen Vorgänge der DELLA- und JAZ-Faktoren in *cpk28* notwendig, beispielsweise durch Untersuchungen zur Proteinstabilität oder auch Interaktionsfähigkeit dieser Repressoren. Diese Prozesse könnten vielleicht sogar durch direkte Phosphorylierung durch CPK28 beeinflusst sein. In Reis konnte GA-abhängige Phosphorylierung des DELLA-Proteins SLENDER RICE1 (SLR1) gezeigt werden, was nachfolgend zu DELLA-Degradation führte (Itoh *et al.* 2005). CPK28 würde damit also direkt das Gleichgewicht zwischen DELLAs und JAZ-Proteinen regulieren, in dem es koordinierte Degradation einer der beiden Komponenten vermittelt. Ein Defekt in der GA-Signaltransduktion würde damit nachfolgend verstärkte JA-Signaltransduktion bewirken.

4.4. Entwicklungsspezifisches Calcium: Wie wird CPK28 aktiviert?

Die Beschreibung des *cpk28*-Phänotyps bietet eines der wenigen Beispiele, in denen CDPKs in einem Entwicklungsprozess beschrieben werden. Durch die molekulare Funktion als calcium-abhängige Proteinkinase stellt sich unweigerlich die Frage nach der Herkunft des CPK28-aktivierenden Calcium-Stimulus'. Für abiotische und biotische Stress-Signalkaskaden konnten Erhöhungen des cytoplasmatischen Calcium-Levels durch diverse Stimuli identifiziert werden, wie z. B. das Phytohormon ABA (Allen *et al.* 2001) oder pathogen-assoziierte Elizitoren wie *flg22* (Ranf *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu gibt es kaum Informationen über entwicklungspezifisch generierte Calcium-Stimuli, die die CPK28 in seiner Funktion in der hormonellen Regulation und als Koordinator der Sprosselongation und des sekundären Dickenwachstums aktivieren können.

4.4.1. Calcium und Gibberellin

Der CPK28-aktivierende Calcium-Stimulus könnte durch GA als Signalmolekül hervorgerufen werden, vielleicht durch einen für die Sprosselongation bzw. die reproduktive Phase spezifischen GA-Stimulus (Evans 1999). Dieser würde durch CPK28 als positiven Regulator der GA-Homöostase zu einem weiteren Anstieg des GA-Gehaltes führen, was in *Arabidopsis* nach Blühinduktion tatsächlich beobachtet wurde (Eriksson *et al.* 2006). GA-Behandlung kann zum Anstieg des cytosolischen Calcium-Levels führen (Bush 1996, Gilroy 1996), wobei diese Regulation in Aleuronzellen von Weizen und Gerste beobachtet wurde und damit einen gänzlich anderen biologischen Kontext betrifft als für CPK28 beschrieben. Allerdings konnte Repression der gibberellin-abhängigen Elongation von Sprosssegmenten in Hafer durch Calciumantagonisten festgestellt werden, wobei hier spezifisch GA-induzierte Zellelongation, jedoch nicht Elongation in unbehandelten Sprossen inhibiert wurde (Montague 1993). Dies spricht für eine direkte Funktion von Calcium in der GA-induzierten Elongation. Diese Theorie würde eine positive Signalkaskade mittels CPK28 und GA postulieren, in der CPK28, durch GA-induziertes Calcium aktiviert, zur GA-Biosynthese beiträgt, was wiederum weitere GA-abhängige Calcium-Stimuli zur Sprosselongation hervorrufen würde. Unterstützt wird dies durch die bereits diskutierte Möglichkeit für CPK28-induziertes GA in seiner Funktion als mobiles Signal zur Sprosselongation (4.2.4.) (Dayan *et al.* 2012).

4.4.2. CPK28 in der Signalkaskade nach mechanischer Stimulation

Einen Hinweis auf einen potentiellen Wirkungsmechanismus der CPK28 geben Expressionsstudien, die erhöhte *CPK28*-Expression bei Induktion von sekundärem Dickenwachstum durch künstliches Gewicht zeigten (Ko *et al.* 2004). Die Autoren postulieren einen durch das zunehmende Gewicht des elongierenden Sprosses generierten, internen Stimulus, mutmaßlich Calcium, der sekundäres Dickenwachstum initiiert und damit die Stabilität des Sprosses verbessert. In Pappel konnte beispielsweise während der Reaktivierung des Kambiums im Frühling ein starker Anstieg des Calciumgehalts im Kambium festgestellt werden (Lautner und Fromm 2010), ein Prozess, der in *Arabidopsis* nicht genauso stattfindet aber vielleicht mit dem Beginn des sekundären Dickenwachstums durch Initiation des interfaszikulären Kambiums verglichen werden kann. Eine weitere Analyse zu Genexpression bei Berührung identifizierte *CPK28* neben vielen calcium-bindenden, stressinduzierten und zellwand-modifizierenden Genen zusätzlich als berührungsinduziertes Gen (Lee *et al.* 2005b). Expression der *CPK28* wird also tatsächlich durch mechanische Reize stimuliert, die durch unterschiedliche Umweltsignale vermittelt werden können.

Mechanische Belastung wie Berührung oder Wind führt bei Pflanzen zum Anstieg cytosolischen Calciums (Knight *et al.* 1991, Knight *et al.* 1992) und zur Anschaltung calcium-abhängiger Signalkaskaden. Vor allem Experimente im Wurzelhaar- und Pollenschlauchwachstum lieferten hier Hinweise auf den Ablauf mechanischer Stresswahrnehmung (Monshausen und Gilroy 2009). Die erste Auswirkung von Belastung zeichnet sich durch Deformation der Zellwand aus und wird aufgrund der bei normalem Zellturgor enganliegenden Plasmamembran sofort auf diese übertragen (Monshausen und Gilroy 2009). Die belastungsinduzierte Zugspannung der Plasmamembran führt zur Öffnung von Calcium-Kanälen und cytoplasmatischem Calcium-Anstieg, der unter anderem pH-Wert-Änderungen des Cytosols und der Zellwand bewirkt. Gleichzeitig konnte Aktivierung membranständiger NADPH-Oxidasen gezeigt werden, die Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Zellwand verursachen (Monshausen *et al.* 2009), welche zusätzlich in die Zelle zurückdiffundieren können. Calcium-Anstieg, pH-Wert-Senkung und ROS treiben cytosolische Signalkaskaden unter anderem zur Expression berührungsinduzierter Gene voran (Kurusu *et al.* 2013). Für reaktive Sauerstoffspezies ist nicht nur die Funktion in der Signaltransduktion bekannt, zusammen mit dem erhöhtem pH-Wert in der Zellwand können sie ebenso direkt die Rigidität der Zellwandmatrix mittels intermolekularer Quervernetzung von Zellwandpolymeren verstärken (Monshausen und Gilroy 2009).

Als Kandidaten der bisher unbekanntenen Calcium-Kanäle zur Generation des mechano-induzierten Calcium-Anstiegs werden neben verschiedenen membranständigen rezeptor-ähnlichen Kinasen (Seifert und Blaukopf 2010) auch andere membranständige Proteine (*MscS-like* = MSL-Proteine, *mid1-complementing activity* = MCA-Proteine) diskutiert (Kurusu *et al.* 2013). Die Funktion von MCA1 war für Lignindeposition nach Zellwandbeschädigung essentiell, ein Vorgang, der in Abhängigkeit von Calcium, ROS und JA die Funktionalität der Zellwand nach Beschädigung aufrechterhalten soll (Denness *et al.* 2011). Nachdem auch wachstumsabhängige Zellexpansion den ständigen Umbau der Zellwand erfordert (Cosgrove 2005), werden für Wachstumsprozesse ähnliche Signalkaskaden postuliert (Monshausen und Gilroy 2009). Auf diese Weise trägt also ein calcium-induzierter Vorgang direkt zur Reaktion von Pflanzen auf mechanische Belastung bei. Zellwand-abhängige Calcium-Signalkaskaden können also direkt mit der Modifizierung des Pflanzenwachstums mittels Veränderung der Zellwandeigenschaften verbunden werden.

Eine potentielle Rolle für CPK28 ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Als berührungs-induziertes Protein, das in der Induktion von sekundärem Dickenwachstum identifiziert wurde (Ko *et al.* 2004, Lee *et al.* 2005b), könnte man sich folgendes Szenario vorstellen: durch Veränderungen der Zellwand, möglicherweise durch das Gewicht des

elongierenden Sprosses induziert, erfolgt Calcium-Anstieg im Cytoplasma und führt zur Aktivierung von CPK28, die, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, eine reprimierende Wirkung auf die Induktion des sekundären Dickenwachstums hat. Dies könnte vielleicht durch direkte oder indirekte Inhibition der ROS-Produktion durch NADPH-Oxidasen geschehen, wodurch die ROS-induzierte Zellwandverstärkung und nachfolgende Lignifizierung unterdrückt würden. Übereinstimmend damit konnte für *cpk28* erhöhte Expression der NADPH-Oxidase *RBOHD* und erhöhte ROS-Produktion nach *flg22*-Stimulus beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). *In vitro*-Phosphorylierung von zwei RBOHD-Peptiden durch CPK28 wurde in dieser Arbeit gezeigt (Abb. 3-38), eine direkte, inaktivierende Phosphorylierung *in vivo* wäre also denkbar. Wenn im Fall des CPK28-Funktionsverlusts die NADPH-Oxidase-Repression aufgehoben und damit mehr ROS produziert würde, könnte dies zu einer übermäßig verfestigten Zellwand und erhöhter Lignindeposition führen. Diese Lignifizierung findet, wenn durch Inhibition der Cellulose-Biosynthese induziert, nur in Anwesenheit funktionaler RBOHD statt (Hamann *et al.* 2009, Denness *et al.* 2011).

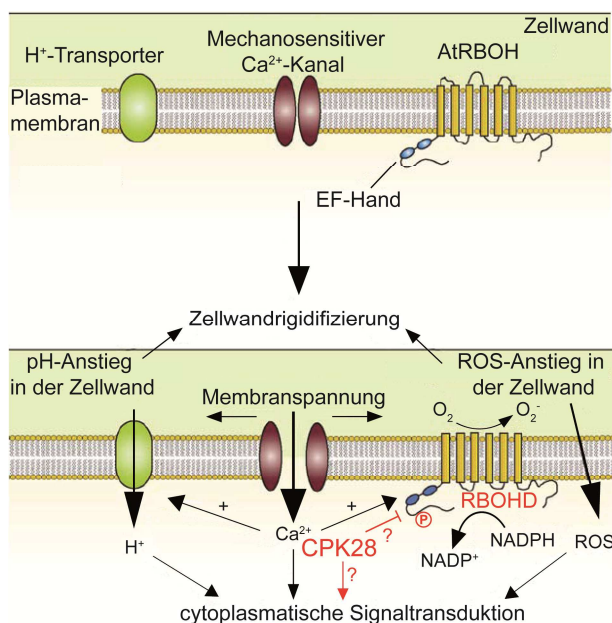


Abbildung 4-1: Modell für die Rolle der CPK28 in der Wahrnehmung von mechanischem Stress. Das hier gezeigte Modell adaptiert Erkenntnisse aus der Untersuchung der durch mechanischen Stress induzierten Plasmamembran-Signalkaskaden von Wurzelhaar- und Pollenschlauchelongation. Membranspannung führt zur Öffnung von Calcium-Kanälen, was pH-Wert-Veränderung und NADPH-abhängige ROS-Akkumulation in Zellwand und Cytoplasma verursacht. Veränderter pH, Calcium und ROS initiieren cytoplasmatische Signalkaskaden, während extrazelluläre ROS und erhöhter pH die Rigidität der Zellwand verstärken. CPK28 (rot) vollzieht hier eine durch mechanischen Calcium-Stimulus aktivierte Rolle als cytoplasmatischer Repressor der ROS-Produktion, vielleicht durch direkte inhibitorische Phosphorylierung der RBOHD. Dies führt zu koordinierter Zellwandverstärkung und zu kontrolliertem sekundärem Dickenwachstum. Abbildung verändert nach Monshausen und Gilroy (2009).

Dieses Modell der CPK28-Funktion wird von der Tatsache unterstützt, dass für die ebenfalls in Untergruppe IV des CPK-Stammbaums positionierte CDPK1 aus *Medicago truncatula* (Stammbaum in Boudsocq und Sheen (2013)) ähnliche zelluläre Auswirkungen beschrieben sind. Unterdrückung der *MtCDPK1*-Expression führte zu erhöhter ROS-Produktion und Expressionssteigerung von Zellwand-Biosynthese-Genen (Ivashuta *et al.* 2005), somit könnte *MtCDPK1* als ebenso wie *NaCDPK4* und *NaCDPK5* ein Homolog der *AtCPK28* darstellen.

Auch viele genomweite Expressionsanalysen unter verschiedensten Bedingungen bzw. Behandlungen deuten auf eine Bedeutung der CPK28 in der zellwand-abhängigen Signaltransduktion hin: Die bereits genannte gewichtsabhängige Induktion des sekundären Dickenwachstums oder Berührung, aber auch Ethylen-, Kälte- oder H₂O₂-Behandlung, Bindung von Arabinogalactan-Proteinen der Zellwand mittels eines synthetischen Inhibitors oder Überexpression eines Transkriptionsfaktors in der DNA-Replikation führen neben Expressionssteigerung verschiedener zellwand-modifizierender, oft auch abwehrspezifischer Gene, immer auch zu erhöhter *CPK28*-Expression (Vlieghe *et al.* 2003, De Paepe *et al.* 2004, Guan und Nothnagel 2004, Ko *et al.* 2004, Davletova *et al.* 2005, Lee *et al.* 2005a, Lee *et al.* 2005b). Diese Kopplung der Expressionssteigerung zellwand-modifizierender Gene und *CPK28* spricht für einen funktionalen Zusammenhang zwischen CPK28 und dem Zellwand-Metabolismus oder auch der Zellwand-Signaltransduktion.

In diesem Modell wäre die für *cpk28* beobachtete Hormon-Deregulation vielleicht nur ein sekundärer Effekt des CPK28-Funktionsverlusts, der durch verstärkte Induktion des Zellwandmetabolismus‘ ohne reprimierende Funktion der CPK28 hervorgerufen werden könnte. Wie schon in 4.3.3. erwähnt, können Zellwand-Veränderungen JA-Signaltransduktion und erhöhte JA-Level initiieren (Ellis *et al.* 2002a, Caño-Delgado *et al.* 2003, Hamann *et al.* 2009). Im Zuge der Bedeutung von JA im sekundären Dickenwachstum wird JA-Akkumulation von den Autoren auch als Effekt der zellwand-abhängigen Mechanostimulation diskutiert (Sehr *et al.* 2010). Auch führte chemisch-induzierte Zellwandbeschädigung in Abhängigkeit der Funktionalität von RBOHD zu ektopischer Lignindeposition in Wurzeln von Keimlingen (Denness *et al.* 2011). Eine Untersuchung des potentiellen Einflusses der CPK28 auf die Regulation dieser Prozesse ist unbedingt notwendig.

Über einen direkten Effekt von Zellwand-Modifikation oder Mechano-Stimulation auf die Gibberellin-Homöostase der Pflanzen gibt es keine detaillierten Informationen. Allerdings ist Gibberellin insofern in die Regulation von Zellwandmodifikationen involviert, indem es die Expression von Expansinen stimuliert, die eine Rolle in der Auflockerung von Zellwandstrukturen während der Zellelongation spielen (Cosgrove 2005). Transkriptionsanalysen konnten zeigen, dass DELLAs als Repressoren der GA-Signaltransduktion die Expression vieler Zellwand-Biosynthese-Komponenten und zellwand-modifizierender Enzyme inhibieren (Cao *et al.* 2006). Behandlung mit Gibberellin bzw. dessen Biosynthese-Inhibitor Paclobutrazol löste weitführende Modifikation der Genexpression im Zellwand-Metabolismus aus (Ribeiro *et al.* 2012). Reduzierter GA-Gehalt in *cpk28* könnte unter anderem zu übermäßiger Zellwandverhärtung aufgrund reduzierter GA-abhängiger Zellwandlockerung und damit verminderter Zellexpansion führen. Applikation von

exogenem GA könnte durch Zellwandauflockerung diese Verhärtung zumindest teilweise beschränken, was im Falle der *cpk28* die partielle Reversion der Sprosselongation nach GA-Behandlung trotz erhöhter Lignifizierung (Abb. 3-26, 3-32) erklären würde. Die bereits diskutierte, antagonistische Wechselwirkung zwischen JA und GA (4.3.4.) könnte also GA-Reduktion als Folge zellwand-induzierter JA-Akkumulation bewirken und die beschriebenen hormonabhängigen Ausprägungen des *cpk28*-Phänotyps erklären.

Aus biologischer Sicht ist die beschriebene zellwand-abhängige Regulation des sekundären Dickenwachstums sicherlich sinnvoll. Bei Wahrnehmung eines Belastungsstressses oder auch während der Wachstumsphase des Sprosses werden Elongationseignisse wie Längenwachstum kontrolliert und sekundäres Dickenwachstum initiiert, um einerseits durch kambiale Zellteilung Zugspannung im belasteten Gewebe zu vermindern und andererseits den Spross zu verstärken. CPK28 stellt in diesem Modell also einen negativen Regulator des sekundären Dickenwachstums dar, der je nach mechanischer Belastung des Sprosses calcium-abhängig Sprosselongation und sekundäres Dickenwachstum koordiniert.

5. Literatur

- Abbasi, F., Onodera, H., Toki, S., Tanaka, H. und Komatsu, S.** (2004) *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol*, **55**, 541-552.
- Aboelsaad, M. und Wu, R.** (1995) A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol*, **108**, 787-793.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffman, T., Tang, Y.Y., Grill, E. und Schroeder, J.I.** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, **411**, 1053-1057.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.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.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. und Ecker, J.R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Amasino, R.M. und Michaels, S.D.** (2010) The timing of flowering. *Plant Physiol*, **154**, 516-520.
- Balazadeh, S., Riano-Pachon, D.M. und Mueller-Roeber, B.** (2008) Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* **10 Suppl 1**, 63-75.
- Barton, M.K.** (2010) Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev Biol*, **341**, 95-113.
- Berendzen, K.W., Böhmer, M., Wallmeroth, N., Peter, S., Vesic, M., Zhou, Y., Tiesler, F.K.E., Schleifenbaum, F. und Harter, K.** (2012) Screening for *in planta* protein-protein interactions combining bimolecular fluorescence complementation with flow cytometry. *Plant Methods*, **8**.
- Beyhl, D., Hortensteiner, S., Martinoia, E., Farmer, E.E., Fromm, J., Marten, I. und Hedrich, R.** (2009) The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J*, **58**, 715-723.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Proebsting, W.M., Hortensteiner, S., Chetelat, A., Martinoia, E. und Farmer, E.E.** (2007) A gain-of-function allele of *TPC1* activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. *Plant J*, **49**, 889-898.
- Bonawitz, N.D. und Chapple, C.** (2010) The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet*, **44**, 337-363.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.-T. und Pont-Lezica, R.** (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, **5**, 212-221.
- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Barbier-Brygoo, H. und Lauriere, C.** (2007) Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, **63**, 491-503.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.H. und Sheen, J.** (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺-sensor protein kinases. *Nature*, **464**, 418-422.

- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Regad, L. und Lauriere, C.** (2012) Characterization of *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? *Biochem J*, **447**, 291-299.
- Boudsocq, M. und Sheen, J.** (2013) CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci*, **18**, 30-40.
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H. und Schroeder, J.I.** (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 10593-10598.
- Brinkmann, K., Blaschke, L. und Polle, A.** (2002) Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. *J Chem Ecol*, **28**, 2483-2501.
- Bush, D.S.** (1996) Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta*, **199**, 89-99.
- Caño-Delgado, A.I., Metzlafl, K. und Bevan, M.W.** (2000) The *eli1* mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **127**, 3395-3405.
- Caño-Delgado, A.I., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. und Bevan, M.** (2003) Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **34**, 351-362.
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H.M. und Peng, J.** (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **142**, 509-525.
- Cao, F.Q., Werner, A.K., Dahncke, K., Romeis, T., Liu, L.H. und Witte, C.P.** (2010) Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiol*, **154**, 98-108.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T. und Raikhel, N.V.** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell*, **16**, 3285-3303.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. und Sheen, J.** (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*, **129**, 469-485.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L. und Solano, R.** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666-671.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, **1**, 581-585.
- Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J.F. und Chazin, W.J.** (2004) Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **279**, 29092-29100.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**, 735-743.
- Coca, M. und Segundo, B.** (2010) *AtCPK1* calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant J*, **63**, 526-540.
- Cosgrove, D.J.** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 850-861.

- Curran, A., Chang, I.F., Chang, C.L., Garg, S., Miguel, R.M., Barron, Y.D., Li, Y., Romanowsky, S., Cushman, J.C., Gribskov, M., Harmon, A.C. und Harper, J.F. (2011) Calcium-dependent protein kinases from *Arabidopsis* show substrate specificity differences in an analysis of 103 substrates. *Front Plant Sci*, **2**, 36.
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R. und Udvardi, M.K. (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J*, **38**, 366-379.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G. und Harper, J.F. (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **132**, 1840-1848.
- Davis, S.J. (2009) Integrating hormones into the floral-transition pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, **32**, 1201-1210.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J. und Mittler, R. (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **139**, 847-856.
- Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T.P., Hedden, P., Fromm, H. und Aloni, R. (2012) Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. *Plant Cell*, **24**, 66-79.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E. und Prat, S. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**, 480-484.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Zabeau, M. und Van Der Straeten, D. (2004) Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J*, **39**, 537-559.
- Deblaere, R., Bytebier, B., Degreve, H., Deboeck, F., Schell, J., Vanmontagu, M. und Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *agrobacterium*-mediated gene-transfer to plants. *Nucleic Acids Res*, **13**, 4777-4788.
- Denness, L., McKenna, J.F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., Mansfield, J., Zipfel, C. und Hamann, T. (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **156**, 1364-1374.
- Depuydt, S. und Hardtke, C.S. (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol*, **21**, R365-373.
- Devlin, P.F., Halliday, K.J., Harberd, N.P. und Whitelam, G.C. (1996) The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time. *Plant J*, **10**, 1127-1134.
- Devlin, P.F., Patel, S.R. und Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1479-1487.
- Dill, A. und Sun, T.P. (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **159**, 777-785.
- Dodd, A.N., Kudla, J. und Sanders, D. (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 593-620.
- Du, J. und Groover, A. (2010) Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation. *J Integr Plant Biol*, **52**, 17-27.
- Durbak, A., Yao, H. und McSteen, P. (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, **15**, 92-96.

- Ebel, J. und Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, **206**, 335-348.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1349-1349.
- Ehltng, J., Mattheus, N., Aeschliman, D.S., Li, E., Hamberger, B., Cullis, I.F., Zhuang, J., Kaneda, M., Mansfield, S.D., Samuels, L., Ritland, K., Ellis, B.E., Bohlmann, J. und Douglas, C.J. (2005) Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J*, **42**, 618-640.
- Ellis, C. und Turner, J.G. (2001) The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*, **13**, 1025-1033.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. und Turner, J.G. (2002a) The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell*, **14**, 1557-1566.
- Ellis, C., Karafyllidis, L. und Turner, J.G. (2002b) Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae* and *Myzus persicae*. *Mol Plant Microbe In*, **15**, 1025-1030.
- Ellis, C. und Turner, J.G. (2002) A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta*, **215**, 549-556.
- Elo, A., Immanen, J., Nieminen, K. und Helariutta, Y. (2009) Stem cell function during plant vascular development. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 1097-1106.
- Eriksson, S., Bohlenius, H., Moritz, T. und Nilsson, O. (2006) GA₄ is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell*, **18**, 2172-2181.
- Eskins, K. (1992) Light-quality effects on *Arabidopsis* development - Red, blue and far-red regulation of flowering and morphology. *Physiol Plantarum*, **86**, 439-444.
- Evans, L.T. (1999) Gibberellins and flowering in long day plants, with special reference to *Lolium temulentum*. *Aust J Plant Physiol*, **26**, 1-8.
- Fankhauser, C. und Chory, J. (1997) Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Bi*, **13**, 203-229.
- Fankhauser, C. und Casal, J.J. (2004) Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *Plant J*, **39**, 747-760.
- Feng, S.H., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J.L., Wang, F., Chen, L.Y., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X.D., Fan, L.M. und Deng, X.W. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, **451**, 475-479.
- Feys, B.J., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. und Turner, J.G. (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, **6**, 751-759.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A. und Parker, J.E. (2005) *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell*, **17**, 2601-2613.

- Finlayson, S.A., Krishnareddy, S.R., Kebrom, T.H. und Casal, J.J. (2010) Phytochrome regulation of branching in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **152**, 1914-1927.
- Fletcher, J.C. (2002) Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, 45-66.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C. und Solano, R. (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol*, **5**, 344-350.
- Franklin, K.A. und Quail, P.H. (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot*, **61**, 11-24.
- Franz, S., Ehlert, B., Liese, A., Kurth, J., Cazale, A.C. und Romeis, T. (2011) Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, **4**, 83-96.
- Fujikawa, Y. und Kato, N. (2007) Technical advance: split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in *Arabidopsis* protoplasts. *Plant J*, **52**, 185-195.
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y. und Takahashi, Y. (2000) REPRESSION OF SHOOT GROWTH, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, **12**, 901-915.
- Gao, X.Q., Chen, X., Lin, W.W., Chen, S.X., Lu, D.P., Niu, Y.J., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., Shan, L.B. und He, P. (2013) Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein kinases. *Plos Pathogens*, **9**, e1003127.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., Romeis, T. und Hedrich, R. (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺-affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 8023-8028.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A.S., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T. und Hedrich, R. (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal*, **4**, ra32.
- Gilroy, S. (1996) Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium-dependent and independent. *Plant Cell*, **8**, 2193-2209.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4645-4649.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P. und Thomas, S.G. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 3399-3414.
- Guan, Y. und Nothnagel, E.A. (2004) Binding of arabinogalactan proteins by yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol*, **135**, 1346-1366.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C. und Lin, C. (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, **279**, 1360-1363.
- Hamann, T., Bennett, M., Mansfield, J. und Somerville, C. (2009) Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *Plant J*, **57**, 1015-1026.

- Han, S.C., Tang, R.H., Anderson, L.K., Woerner, T.E. und Pei, Z.M. (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺-sensing in guard cells. *Nature*, **425**, 196-200.
- Harmon, A.C., Yoo, B.C. und McCaffery, C. (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, **33**, 7278-7287.
- Harper, J.F., Huang, J.F. und Lloyd, S.J. (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, **33**, 7267-7277.
- Harper, J.F., Breton, G. und Harmon, A. (2004) Decoding Ca²⁺-signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 263-288.
- Harper, J.F. und Harmon, A. (2005) Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 555-566.
- Hedden, P. und Thomas, S.G. (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J*, **444**, 11-25.
- Hegeman, A.D., Rodriguez, M., Han, B.W., Uno, Y., Phillips, G.N., Hrabak, E.M., Cushman, J.C., Harper, J.F., Harmon, A.C. und Sussman, M.R. (2006) A phyloproteomic characterization of *in vitro* autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics*, **6**, 3649-3664.
- Heinrich, M., Hettenhausen, C., Lange, T., Wünsche, H., Fang, J., Baldwin, I.T. und Wu, J. (2013) High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J*, **73**, 591-606.
- Hoogendoorn, J., Rickson, J.M. und Gale, M.D. (1990) Differences in leaf and stem anatomy related to plant height of tall and dwarf wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Physiol*, **136**, 72-77.
- Hossain, Z., McGarvey, B., Amyot, L., Gruber, M., Jung, J. und Hannoufa, A. (2012) DIMINUTO 1 affects the lignin profile and secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Planta*, **235**, 485-498.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y. und Yu, H. (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell*, **19**, 884-894.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J. und Ryan, C.A. (1996) An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*, **8**, 2067-2077.
- Howe, G.A. (2010) Ubiquitin ligase-coupled receptors extend their reach to jasmonate. *Plant Physiol*, **154**, 471-474.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K. und Harmon, A.C. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, **132**, 666-680.
- Huijser, P. und Schmid, M. (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, **138**, 4117-4129.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H.J., Yu, J., Nam, S.J., Ko, J., Park, J.Y., Seo, Y.S., Kim, E.Y., Ryu, S.B., Kim, W.T., Lee, Y.H., Kang, H. und Lee, I. (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell*, **14**, 183-192.
- Imlau, A., Truernit, E. und Sauer, N. (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, **11**, 309-322.

- Irshad, M., Canut, H., Borderies, G., Pont-Lezica, R. und Jamet, E.** (2008) A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol*, **8**.
- Ishida, S., Yuasa, T., Nakata, M. und Takahashi, Y.** (2008) A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins. *Plant Cell*, **20**, 3273-3288.
- Israelsson, M., Sundberg, B. und Moritz, T.** (2005) Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *Plant J*, **44**, 494-504.
- Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. und Takahashi, Y.** (2010) Alteration of substrate specificity: the variable N-terminal domain of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase is important for substrate recognition. *Plant Cell*, **22**, 1592-1604.
- Itoh, H., Sasaki, A., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., Minami, E., Ashikari, M. und Matsuoka, M.** (2005) Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol*, **46**, 1392-1399.
- Ivashuta, S., Liu, J.Y., Liu, J.Q., Lohar, D.P., Haridas, S., Bucciarelli, B., VandenBosch, K.A., Vance, C.P., Harrison, M.J. und Gantt, J.S.** (2005) RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development. *Plant Cell*, **17**, 2911-2921.
- Jaworski, K., Pawelek, A., Kopcewicz, J. und Szmidi-Jaworska, A.** (2012) The calcium-dependent protein kinase (*Pn*CDPK1) is involved in *Pharbitis nil* flowering. *J Plant Physiol*, **169**, 1578-1585.
- Jiao, Y., Lau, O.S. und Deng, X.W.** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet*, **8**, 217-230.
- Kagawa, T., Kimura, M. und Wada, M.** (2009) Blue light-induced phototropism of inflorescence stems and petioles is mediated by phototropin family members phot1 and phot2. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1774-1785.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. und Fankhauser, C.** (2010) Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol*, **91**, 29-66.
- Kanchiswamy, C.N., Takahashi, H., Quadro, S., Maffei, M.E., Bossi, S., Berteza, C., Zebelo, S.A., Muroi, A., Ishihama, N., Yoshioka, H., Boland, W., Takabayashi, J., Endo, Y., Sawasaki, T. und Arimura, G.** (2010) Regulation of *Arabidopsis* defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling. *BMC Plant Biol*, **10**.
- Kazan, K. und Manners, J.M.** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci*, **17**, 22-31.
- King, K.E., Moritz, T. und Harberd, N.P.** (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics*, **159**, 767-776.
- Kleinboelting, N., Huet, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P. und Weisshaar, B.** (2012) GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res*, **40**, D1211-D1215.
- Klimecka, M. und Muszynska, G.** (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol*, **54**, 219-233.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. und Trewavas, A.J.** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, **352**, 524-526.

- Knight, M.R., Smith, S.M. und Trewavas, A.J.** (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4967-4971.
- Ko, J.H., Han, K.H., Park, S. und Yang, J.** (2004) Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol*, **135**, 1069-1083.
- Komatsu, S., Yang, G.X., Khan, M., Onodera, H., Toki, S. und Yamaguchi, M.** (2007) Over-expression of calcium-dependent protein kinase13 and calreticulin interacting protein1 confers cold tolerance on rice plants. *Mol Genet Genomics*, **277**, 713-723.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., Rolff, E. und Spruit, C.J.P.** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z Pflanzenphysiol*, **100**, 147-160.
- Koornneef, M. und Vanderveen, J.H.** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet*, **58**, 257-263.
- Krupkova, E., Immerzeel, P., Pauly, M. und Schmülling, T.** (2007) The *TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2* gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and coordinated plant development. *Plant J*, **50**, 735-750.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. und Demura, T.** (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev*, **19**, 1855-1860.
- Kudla, J., Batistic, O. und Hashimoto, K.** (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, **22**, 541-563.
- Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y. und Iida, H.** (2013) Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport. *Trends Plant Sci*, **18**, 227-233.
- Lachaud, C., Prigent, E., Thuleau, P., Grat, S., Da Silva, D., Briere, C., Mazars, C. und Cotelle, V.** (2013) 14-3-3-regulated Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death Differ*, **20**, 209-217.
- Lau, O.S. und Deng, X.W.** (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol*, **13**, 571-577.
- Lautner, S. und Fromm, J.** (2010) Calcium-dependent physiological processes in trees. *Plant Biol* **12**, 268-274.
- Lee, B.-H., Henderson, D.A. und Zhu, J.-K.** (2005a) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, **17**, 3155-3175.
- Lee, D., Polisensky, D.H. und Braam, J.** (2005b) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and *XTH* genes. *New Phytol*, **165**, 429-444.
- Lee, K.J., Marcus, S.E. und Knox, J.P.** (2011) Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Mol Plant*, **4**, 212-219.
- Lee, S.S., Cho, H.S., Yoon, G.M., Ahn, J.W., Kim, H.H. und Pai, H.S.** (2003) Interaction of *NtCDPK1* calcium-dependent protein kinase with *NtRpn3* regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum*. *Plant J*, **33**, 825-840.
- Li, J.-F., Bush, J., Xiong, Y., Li, L. und McCormack, M.** (2011) Large-scale protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts by split firefly luciferase complementation. *Plos One*, **6**, e27364.

- Liese, A. und Romeis, T.** (2012) Biochemical regulation of *in vivo* function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochim Biophys Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.024>.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. und Hake, S.** (1994) A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, **6**, 1859-1876.
- Loreti, E., Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A. und Perata, P.** (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytol*, **179**, 1004-1016.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D. 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**, 10736-10741.
- Maffei, M., Bossi, S., Spitterer, D., Mithöfer, A. und Boland, W.** (2004) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions and regurgitate components. *Plant Physiol*, **134**, 1752-1762.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W.X., Legen, J., Hilger, H.H. und Romeis, T.** (2013) Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *Plant J*, **73**, 883-896.
- Mauriat, M. und Moritz, T.** (2009) Analyses of *GA20ox*- and *GID1*-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant J*, **58**, 989-1003.
- Mauriat, M., Sandberg, L.G. und Moritz, T.** (2011) Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen. *Plant J*, **67**, 805-816.
- McAinsh, M.R. und Pittman, J.K.** (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol*, **181**, 275-294.
- Mehlmer, N.** (2008) Ca²⁺-dependent protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. In *Dep of Biochem, Max F. Perutz Lab*. Wien: Universität Wien, pp. 89.
- Memelink, J.** (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, **70**, 1560-1570.
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K. und Ohme-Takagi, M.** (2005) The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell*, **17**, 2993-3006.
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K. und Ohme-Takagi, M.** (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 270-280.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Weisenseel, M.H. und Gilroy, S.** (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, **21**, 2341-2356.
- Monshausen, G.B. und Gilroy, S.** (2009) Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol*, **19**, 228-235.
- Montague, M.J.** (1993) Calcium antagonists inhibit sustained gibberellic acid-induced growth of *Avena* (Oat) Stem Segments. *Plant Physiol*, **101**, 399-405.

- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y.Z., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriach, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M. und Schroeder, J.I. (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+} -permeable channels and stomatal closure. *Plos Biol*, **4**, 1749-1762.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Sym*, **51**, 263-273.
- Munemasa, S., Hossain, M.A., Nakamura, Y., Mori, I.C. und Murata, Y. (2011) The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiol*, **155**, 553-561.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P. und Hakoshima, T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*, **456**, 459-463.
- Myers, C., Romanowsky, S.M., Barron, Y.D., Garg, S., Azuse, C.L., Curran, A., Davis, R.M., Hatton, J., Harmon, A.C. und Harper, J.F. (2009) Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *Plant J*, **59**, 528-539.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P. und Jones, J.D. (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol*, **18**, 650-655.
- Neff, M.M. und Chory, J. (1998) Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol*, **118**, 27-36.
- Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, I.N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y. und Shiina, T. (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, **3**, 926.
- Ojo, K.K., Larson, E.T., Keyloun, K.R., Castaneda, L.J., DeRocher, A.E., Inampudi, K.K., Kim, J.E., Arakaki, T.L., Murphy, R.C., Zhang, L., Napuli, A.J., Maly, D.J., Verlinde, C.L.M.J., Buckner, F.S., Parsons, M., Hol, W.G.J., Merritt, E.A. und Van Voorhis, W.C. (2010) *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 is a target for selective kinase inhibitors. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 602-607.
- Oyama, T., Shimura, Y. und Okada, K. (1997) The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*, **11**, 2983-2995.
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. und Feyereisen, R. (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J*, **31**, 1-12.
- Patharkar, O.R. und Cushman, J.C. (2000) A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant J*, **24**, 679-691.
- Pauwels, L., Inze, D. und Goossens, A. (2009) Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci*, **14**, 87-91.
- Pauwels, L. und Goossens, A. (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell*, **23**, 3089-3100.
- Peiter, E., Maathuis, F.J.M., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M. und Sanders, D. (2005) The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*, **434**, 404-408.

- Pouteau, S. und Albertini, C.** (2009) The significance of bolting and floral transitions as indicators of reproductive phase change in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, **60**, 3367-3377.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C. und Hardtke, C.S.** (2011) Mobile gibberellin directly stimulates *Arabidopsis* hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell*, **23**, 1322-1336.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. und Scheel, D.** (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J*, **68**, 100-113.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. und Chory, J.** (1993) Mutations in the gene for the red far-red light receptor Phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, **5**, 147-157.
- Reeves, P.H. und Coupland, G.** (2001) Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiol*, **126**, 1085-1091.
- Ribeiro, D.M., Araújo, W.L., Fernie, A.R., Schippers, J.H.M. und Mueller-Roeber, B.** (2012) Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, **63**, 2769-2786.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-Ali, T. und Harberd, N.P.** (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **52**, 67-88.
- Richter, R., Behringer, C., Müller, I.K. und Schwechheimer, C.** (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev*, **24**, 2093-2104.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P. und Phillips, A.L.** (2008a) Genetic analysis reveals that C₁₉-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 2420-2436.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., Phillips, A.L. und Hedden, P.** (2008b) The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *Plant J*, **53**, 488-504.
- Ritchie, S. und Gilroy, S.** (1998) Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiol*, **116**, 765-776.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R. und Jones, J.D.G.** (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J*, **20**, 5556-5567.
- Rosso, M., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B.** (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol*, **53**, 247-259.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C. und Schaller, A.** (2002) *LeCPK1*, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol*, **129**, 156-168.
- Saha, P. und Singh, M.** (1995) Characterization of a winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) protein-kinase with calmodulin-like domain-regulation by autophosphorylation. *Biochem J*, **305**, 205-210.

- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. und Izui, K. (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, **23**, 319-327.
- Sanchez-Rodriguez, C., Rubio-Somoza, I., Sibout, R. und Persson, S. (2010) Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci*, **15**, 291-301.
- Sanchez, P., Nehlin, L. und Greb, T. (2012) From thin to thick: major transitions during stem development. *Trends Plant Sci*, **17**, 113-121.
- Schwechheimer, C. (2011) Gibberellin signaling in plants - the extended version. *Front Plant Sci*, **2**, 107.
- Schweighofer, A., Hirt, H. und Meskiene, L. (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*, **9**, 236-243.
- Sehr, E.M., Agusti, J., Lehner, R., Farmer, E.E., Schwarz, M. und Greb, T. (2010) Analysis of secondary growth in the *Arabidopsis* shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *Plant J*, **63**, 811-822.
- Seifert, G.J. und Blaukopf, C. (2010) Irritable walls: The plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiol*, **153**, 467-478.
- Sharma, A. und Komatsu, S. (2002) Involvement of a Ca²⁺-dependent protein kinase component downstream to the gibberellin-binding phosphoprotein, RuBisCO activase, in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 690-695.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H. und Matsuoka, M. (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature*, **456**, 520-523.
- Shin, J., Park, E. und Choi, G. (2007) PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J*, **49**, 981-994.
- Sibout, R., Plantegenet, S. und Hardtke, C.S. (2008) Flowering as a condition for xylem expansion in *Arabidopsis* hypocotyl and root. *Curr Biol*, **18**, 458-463.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. und Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**, 755-767.
- Stael, S., Rocha, A.G., Wimberger, T., Anrather, D., Vothknecht, U.C. und Teige, M. (2012) Cross-talk between calcium signalling and protein phosphorylation at the thylakoid. *J Exp Bot*, **63**, 1725-1733.
- Stintzi, A. und Browse, J. (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10625-10630.
- Sun, T.P. und Gubler, F. (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 197-223.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (2007) The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 805-818.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G.H., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. und Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 661-665.
- Turner, J.G., Ellis, C. und Devoto, A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, **14**, S153-S164.

- Umbrasaite, J., Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Magyar, Z., Ayatollahi, Z., Unterwurzacher, V., Choopayak, C., Boniecka, J., Murray, J.A.H., Bogre, L. und Meskiene, I. (2010) MAPK phosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in *Arabidopsis*. *Plos One*, **5**, e15357.
- Updegraff, L.A. (1960) Continuous and automatic measurement of moisture in coal by capacitance. *T Am I Min Met Eng*, **217**, 171-173.
- Vince, D. (1967) Gibberellic acid and light inhibition of stem elongation. *Planta*, **75**, 291-308.
- Vlieghe, K., Vuylsteke, M., Florquin, K., Rombauts, S., Maes, S., Ormenese, S., Van Hummelen, P., Van de Peer, Y., Inze, D. und De Veylder, L. (2003) Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *J Cell Sci*, **116**, 4249-4259.
- 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 J*, **33**, 949-956.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R. und Kudla, J. (2008) Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta*. *Plant J*, **56**, 505-516.
- Wang, H.Z. und Dixon, R.A. (2012) On-off switches for secondary cell wall biosynthesis. *Mol Plant*, **5**, 297-303.
- Wang, W.-H., Yi, X.-Q., Han, A.-D., Liu, T.-W., Chen, J., Wu, F.-H., Dong, X.-J., He, J.-X., Pei, Z.-M. und Zheng, H.-L. (2012) Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, **63**, 177-190.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, **100**, 681-697.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E. und Hetherington, A.M. (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Adv Bot Res*, **22**, 45-96.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J.C. (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain-reaction. *Gene*, **151**, 119-123.
- Weinl, S., Held, K., Schlücking, K., Steinhorst, L., Kuhlert, S., Hippler, M. und Kudla, J. (2008) A plastid protein crucial for Ca²⁺-regulated stomatal responses. *New Phytol*, **179**, 675-686.
- Wernimont, A.K., Artz, J.D., Finerty, P., Lin, Y.H., Amani, M., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., Vedadi, M., Tempel, W., Mackenzie, F., Chau, I., Lourido, S., Sibley, L.D. und Hui, R. (2010) Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 596-601.
- Wernimont, A.K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J.C., Artz, J.D., Lin, Y.H., Lew, J., Hutchinson, A. und Hui, R. (2011) Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins*, **79**, 803-820.
- Wild, M., Daviere, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P. und Achard, P. (2012) The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell*, **24**, 3307-3319.

- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A. und Schwechheimer, C.** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 1209-1220.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. und Provart, N.J.** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *Plos One*, **2**, e718.
- Witte, C.P., Noel, L.D., Gielbert, J., Parker, J.E. und Romeis, T.** (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol*, **55**, 135-147.
- Witte, C.P., Keinath, N., Dubiella, U., Demouliere, R., Seal, A. und Romeis, T.** (2010) Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated *in vivo* as part of a kinase cascade that regulates stress response. *J Biol Chem*, **285**, 9740-9748.
- Wolters, H. und Jürgens, G.** (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet*, **10**, 305-317.
- Woody, S., Austin-Phillips, S., Amasino, R. und Krysan, P.** (2007) The WiscDsLox T-DNA collection: an *Arabidopsis* community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J Plant Res*, **120**, 157-165.
- Wu, F.H., Shen, S.C., Lee, L.Y., Lee, S.H., Chan, M.T. und Lin, C.S.** (2009) Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*, **5**.
- Wu, J.Q. und Baldwin, I.T.** (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet*, **44**, 1-24.
- Xu, J., Tian, Y.S., Peng, R.H., Xiong, A.S., Zhu, B., Jin, X.F., Gao, F., Fu, X.Y., Hou, X.L. und Yao, Q.H.** (2010) AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*, **231**, 1251-1260.
- Xu, L.H., Liu, F.Q., Wang, Z.L., Peng, W., Huang, R.F., Huang, D.F. und Xie, D.X.** (2001) An *Arabidopsis* mutant *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated *ArVSP*, *Thi2.1* and *PDF1.2*. *FEBS Lett*, **494**, 161-164.
- Xue, T.T., Wang, D., Zhang, S.Z., Ehltng, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C.C. und Zhong, Y.** (2008) Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *Bmc Genomics*, **9**.
- Yamaguchi, M. und Demura, T.** (2010) Transcriptional regulation of secondary wall formation controlled by NAC domain proteins. *Plant Biotechnol*, **27**, 237-242.
- Yamaguchi, S.** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, **59**, 225-251.
- Yang, D.H., Hettenhausen, C., Baldwin, I.T. und Wu, J.Q.** (2012a) Silencing *Nicotiana attenuata* calcium-dependent protein kinases, *CDPK4* and *CDPK5*, strongly up-regulates wound- and herbivory-induced jasmonic acid accumulations. *Plant Physiol*, **159**, 1591-1607.
- Yang, D.L., Yao, J., Mei, C.S., Tong, X.H., Zeng, L.J., Li, Q., Xiao, L.T., Sun, T.P., Li, J.G., Deng, X.W., Lee, C.M., Thomashow, M.F., Yang, Y.N., He, Z.H. und He, S.Y.** (2012b) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, E1192-E1200.
- Yang, G., Shen, S., Yang, S. und Komatsu, S.** (2003) *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced in response to cold and gibberellin. *Plant Physiol Bioch*, **41**, 369-374.

- Yang, K.Y., Liu, Y.D. und Zhang, S.Q.** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 741-746.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H. und Sheen, J.** (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, **2**, 1565-1572.
- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y. und Sun, T.P.** (2007) Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 3037-3057.
- Zhang, J., Elo, A. und Helariutta, Y.** (2011) *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Curr Opin Biotechnol*, **22**, 293-299.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J. und Wang, X.** (2004) Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9508-9513.
- Zhang, Y. und Turner, J.G.** (2008) Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *Plos One*, **3**, e3699.
- Zhong, R., Demura, T. und Ye, Z.H.** (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 3158-3170.
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L. und Ye, Z.H.** (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 2763-2782.
- Zhou, C., Yin, Y.B., Dam, P. und Xu, Y.** (2010) Identification of novel proteins involved in plant cell-wall synthesis based on protein-protein interaction data. *J Proteome Res*, **9**, 5025-5037.
- Zhu, J.K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, 247-273.
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Xu, Y.H., Zhang, X.Y. und Zhang, D.P.** (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 3019-3036.

Lebenslauf

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

Publikationen

- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W.X., Legen, J., Hilger, H.H. und Romeis, T. (2013)**
Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *Plant J*, **73**, 883-896.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., Romeis, T. und Hedrich, R. (2010)**
Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺-affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 8023-8028.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., Romeis, T. und Hedrich, R. (2009)**
Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 21425-21430.

Poster und Präsentationen

- 2009** Tri-National Arabidopsis Meeting (TNAM) 2009, Köln
Poster: "Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* CDPK in flower onset and development"
- 2010** Tagung Plant Calcium Signaling 2010, Münster
Poster: „Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* CDPK with function in shoot elongation"
- Havel-Spree Colloquium 2010, Berlin
Vortrag: "The calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* and its role in plant development"
- 2011** 24. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen
Poster: "Characterisation of *Arabidopsis thaliana* CPK28 a role in shoot elongation"
- Deutsche Botanikertagung 2011, Berlin
Poster: "Characterisation of *Arabidopsis thaliana* CPK28 with function in shoot elongation"
- 2012** Abschlusstreffen des Konsortiums ERA-PG "Calcium Regulation of Plants Productivity", Berlin
Vortrag: "CPK28 of *Arabidopsis thaliana* is an important factor for internode elongation and vascular development"
- International Conference on Arabidopsis Research (ICAR) 2012, Wien
Poster: "Characterisation of *Arabidopsis thaliana* CPK28 with function in shoot elongation"

Danksagung

Hiermit möchte ich ein großes Dankeschön an alle aussprechen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Als erstes bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Tina Romeis für die Chance in ihrem Labor zu promovieren, für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit. Vielen Dank für dieses spannende Projekt und die Freiheit zum „Spielen“, hilfreiche Gespräche und Motivation. Danke für die Möglichkeit zu Konferenzteilnahmen, die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts und das Vertrauen, dass „die CPK28“ irgendwann mal eine gute Geschichte wird.

Prof. Dr. Margarete Baier gilt herzlicher Dank für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Romeis und AG Witte, die diese fast fünf Jahre im Labor so angenehm gestaltet haben. Vielen Dank für eine gute Arbeitsatmosphäre, helfende Hände, moralische Unterstützung, motivierende Gespräche, lustige Anekdoten und das ein oder andere Feierabend-Bier/Fußball/Laborkino. Vielen Dank Andrea, Anja, Anting, Ben, Guido, Heike, Helen, Kathleen, Marco, Mingjia, Nieves, Oliver, Philipp, Philipp S., Roman, Sergej, Sieke, Silke, Till, Tiziana! Besonderer Dank geht an Peter, den alten Hasen im Labor, der immer eine Antwort auf meine Fragen parat hatte, und ebenso an Britta, die so viele Male mit mir nach Golm getingelt ist. Danke auch an Katharina Hake, die mir in ihrer Bachelor- und jetzt auch Masterarbeit dabei hilft, das Mysterium CPK28 besser kennenzulernen.

Vielen Dank an alle Kooperationspartner, die die Versuchsmöglichkeiten immens erweitert haben: Prof. Dr. Hartmut Hilger (FU Berlin), Prof. Dr. Waltraud Schulze (MPIMPP Golm), Dr. Salma Balazadeh (MPIMPP Golm), Dr. Kenji Hashimoto (AG Kudla, Universität Münster), Dr. Mark Aurel Schöttler (MPIMPP Golm) und Christiane Grüber (FU Berlin).

Ein besonderer Dank gilt den TAs, Renate, Ruth und Karla, die den reibungslosen Ablauf im Labor so tatkräftig unterstützen. Auch den Gärtnern Bernd und Reinhard möchte ich danken, für die unzähligen „5er Ara-Töpfe“, die sie für mich gefüllt haben.

Vielen Dank auch an alle Ehemaligen, allen voran Julia, Ulli und Sandra, die mir beigebracht haben, wie man mit *Arabidopsis* umgeht und wie es in einem Pflanzenlabor so läuft. Danke auch an Sören, mit dem die Zeit in der gemeinsamen „Box“ so amüsant war.

Danke an alle Freunde in Thierhaupten, Augsburg, Regensburg, Berlin und an die Naggn-Truppe, die mir als exotischem Naturwissenschaftler immer mal wieder zum Durchatmen verholfen haben.

Philipp danke ich über alles für seine Unterstützung und Ratschläge, seinen Witz und die große Freude, die er meinem Leben schenkt.

Zuletzt geht ein sehr großes Dankeschön an meine Eltern und meine Schwester für ihre bedingungslose Unterstützung und Hilfe. Danke für das Gefühl, das Richtige zu tun und meinen Weg zu gehen.

6. Anhang

Abbildung 6-1: Genomische Sequenz von CPK28 (At5g66210). schwarz: Promotor; rot: 5'- und 3'- UTR; blau: Introns; gelb: Exons, Start- bzw. Stopp-Codon blau unterlegt

```

ggctcgggtgatgggattttgttttgagaaagaataaatggacaactatgagtgagtaggttagcttggatcatcattttt
gtttgtataccatgtatagatagaagctgtatagtttagttatccaccatctgtttagcttgcctgcatgcatgcccgtgcac
acaccagcgatagctgtaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataa
ccgggttgggtgggctcactagtgatcataattgggtgagagggatccaagttgtataacaaacaaacattaaaatacgtta
ggtagagtagtagtattgtttaataacatggctatgcacacgttttcaatctgagacaagtaaaaaaataaataaataa
cagtttcagttcactactgccaagtaagtgcctccgctcatcataaaaacactttggtttcccattaaaaaaaatacacaac
aatttcttctcttataaccatacatgattaaaataaatttgagcccttacttataataacagcgtacgggtagaagaagg
aaaaagatcggaatacggttgtgctgtggaatggcagctgaaatgtgatgcagtgaccgctcagtgaccggatttgcaaa
agagataattgtttacttctctctgggcaaaattcaattcttaagaagtcgaaccagtagaaaagaaaaagaaaacgtata
cgccttagattgtattataaacattactaaatataatagacgttttagaaaaatggaaatctgtttgaaaagaccaagt
caatttagtagaccaataatctaaggttaagtaatactcagtttgagtagggattgaagacagggactgaatactagtagt
aaaatacacaacaaagatccaggctagtagagggctcactactaaaatagagtttgtagaagaataaataaataaataa
cagagtcataataaatttagtggcaataaataatgataatggcaactctgaagtgaatcgaattgagtccttaccggggg
ATGGTGTCGGGCCCAAACATGGAGCTTCCCACATCCCACAGGGGTGGTCAGTCAGTGGTCTTCGCTTTCACACCAAATA
CAATTCATTATTCTTGACTTCGTGAAATGAcagttaaaatctcagaaatgtataacaacaaaaaaaggttaaaaaaca
cagataataataataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataa
gatcctccttggaggggttcaactcggcgtcttgggtttgaccaactcaacttaataatctctctgcttctctctctctct
tcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
TGTTTCTCCGCCATTAGAGTCACTGGTCTAGCAGCAGTAGACGAAGCAGTCAGACCAAATCCAAGGCTGCTCCCTACTCCC
ATCGATACCAAGGCCTCTACCAAACGCCGAACCGGCTCCATCCCCTGCGGCAAGCGTACCGATTTTGGCTACTCCAAAGAC
TTCCACGATCACTACACCATCGCAAGTTGCTCGGCCATGGTCAATTTCGGCTACACCTACGTCGCCATCCACAGACCCAAT
GGAGATCGCGTCGCCCTCAAAGACTCGATAAGTCTAAGgtacacttttccagcccttactagggtttcttcttcccttt
tactagttgttggatcttctcactaccatctactagattcacatcagaaaaatagttgcccgtatctttaaatttagtt
taaacatgatcccaattgtactttgttttagtttagtttagtcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
tcttactgcatcctctgcttcttgggttcaactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcact
GATGTCAAGCGTGAGGTTCAGATTCTTATTGCTCTCTCTGGCCACGAGAATGTTGTTCAAGTTTCACAATGCCTTTGAGGAT
GACGATTACGTCATATTGTTATGGAGgtgagtccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
acattttactcttgccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
tctcactactctttaaactattaccgggtggaatcgtagaagaacactacctctcattattgatgcttcttcttcttcttctt
tcttctcagGAAAGGTAATCGTACTCCGAGAAAGATGCAGCCGTTGTCGTTAGGCAGATGCTCAAAGTTGCAGGAGAATGTC
ATCTACACGGTCTTGTACATAGAGATATGAAACCAGAGgtacattctcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
ctaataataaatacttctgcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
TCTAAAGGCTACGGATTTTGGTTATCGGATTTTATCAAACCAGgttagtactagctatcaaaatccacacaagcaagta
agtgtaagagcgtatctgttgatcttctgtgataaacaactcaatccttcacagGGAAAAGGTTCCATGACATTGTTGGT
AGCGCCTATTATGTGGCTCTGAGGTATTAAGCGCAGATCAGGGCCTGAATCAGATGTATGGAGCATTGGTGTGATTACG
TATATATTACTTTGTGGGAGCGGCCCTTTTGGGATAGAAGTGAAGATGGTATATTTAAAGAGgtgtagttgaaaactttc
tcttactggatttctatctatagcttttcttatttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
AGAAATAAACCTGACTTCAAGCCTTAACCTTGGCAACTATAAGTGACAGCGCAAAGATTTTGTGAAAAGTTACTTGTGA
AAAGACCCACGAGCAGCGTAACTGCTGCACAAGCACTATgtatgcttctgagtaactaaagttagtttttctatgtgc
ggcggattctttagtaaatgctatcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
TATCCCTGTCGACATTTCAGTTCTGAACAACTTAAGACAATTTGTGAGATACAGCCGCTAAAGCAATTTGCTTTAAGGgt
aagttaaatgaggaagttgttggatggataaaaacaaagtgatccggacatgtctcctaagcttcttcttcttcttcttctt
gCGCTTGTAGCACACTTGACGAGGCAGAGATCTCTGACCTCAGAGATCAATTTGATGCGATTGATGTGGATAAAAATGG
CGTCATTAGTCTTGAAGAGATGAGACAGgtaaaagctcatgatatttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
gatcagttaatctttagcatccatttggccttttcttctacagGCACCTTGCCAAAGATCTTCCCTGGAAACTGAAAGACTC
ACGAGTTGCTGAGATCCTTGAAGCGgtagttatatttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
cgtagttcataatgagccgttgtgtacttgtatcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
CACAGAGTTGTAGCAGCAGCTCTACATGTTCACTAGAAGAACATGATTCAGAGAAATGGCAGCTAAGGTCAAGAGC
AGCTTTTGGAAAATTCGACCTAGACAAAGACGGGTACATAACGCCTGAGGAACCTCGAATGgtaaagctgaactaacctctt
atcaatattctcgtacggtagagtagatgttttaggtaagtgggtgatgaaaccaatttgtttgtgaaatcctcagCACACG
GGTTAAGAGGATCAATAGATCCACTGCTGGATGAAGCAGACATAGACAGAGATGGGAAAATAAGCCTGCATGAGTTGAGG
AGACTTCTAAGAACAGCGAGCATAAGTTCAAGAGAGCACCAGCCCTGCAGGTCACAGGAATCTCGATAGatatacta
gaagaggagtaagtaaggatacagaatgtaatttggttggatgtgatagtcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
aagataagtggggtatcttggcgtttgtagtgataagtaagtaatacttggttggttaaggcgcgcaaaacaaagagag
aaagtgagtgagaatccaattgatgaaatagagagagctcctaaggtgactagatgcaagaggacacgtggcatccc
tgaatgggggcaaaatccaattttaaattttaaattttaaattttaaattttaaattttaaattttaaattttaaattttaaattt
ctatcataatatttctgctgtttccatttttcttataatattcgtttt

```

Für CP28 sind bei TAIR vier Splice-Varianten annotiert, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

Abbildung 6-2: Codierende Sequenzen (CDS) der putativen CPK28-Interaktoren mit interagierender Sequenz. schwarz: CDS; rot oder orange: mit CPK28-interagierende Sequenz im Y2H-Experiment (unterschiedliche Klone mit unterschiedlichen Farben). **A** PP2C (At1g67820), **B** CaS (AT5G23060), **C** Cys (AT4G16500), **D** Glyk (AT3G61010) (für Glyk sind unterschiedliche codierende Sequenzen bei TAIR bzw. NCBI annotiert)

A

CDS PP2C laut TAIR

ATGACTAATAAACTTCGCTCAGAAGAAACAATCACGTCCCTTTCTTCTTTCATGGCTAGTACACTTAGCATTGCGTCACCC
TCTCCTTGTCTATTCCATTGTTCGGTCCAAAAGGTCTCGCCTTTAAAGAGAAAAGACCTACCCACTTAAATATCCCTGAC
CTCAATCCTCAACAACCGATTTCAACTGATTACTTCCGTTTCAGAGAGGGTGACGCAAAGGTCTCGCCTTTAAAGAGAAAAG
AGACCTGCCACCTAAATATCCCTGACCTCAATCCTCAACAACCGATTTCGAACTGATTACTTTCAGTTTCACAGACTTTGCT
CACCAAAACGGCACCCTAAGCTTCCGTGGCAATGGTTTTGGTGTTCGTCTCCAGAAAACGGTAAGAAGAAGTTTATGGAAGAT
ACTCACAGAATTGTTCCCTTGTTCGGTTGGTAACTCCAAAAAGAGTTTCTTTGGAGTTTATGATGGTCATGGAGGTGCTAAA
GCTGCAGAATTGTGGCTGAGAATTTGCACAAAATATGTTGTGAGATGATGGAGAATTGTAAGGGGAAGGAGGAGAAAAGTT
GAAGCCTTTAAGGCTGCTTTTTGAGGACTGATCGTGATTTCTAGAAAAGGGTGTGTTGTGAGTGGTGTCTGCTGTGTTACT
GCTGTGATACAAGATCAGGAGATGATTGTATCAAATTTGGGAGATTGTAGAGCTGTCCTGTGTAGAGCAGGTGTGCTGAG
GCTCTTACTGATGATCACAACCAGGAAGGGATGATGAAAAGGAAAGAATTGAGAGTCAGGGAGGTTATGTGCGATAATCAT
CAAGGGGCTTGGCGAGTTCAGGGAATACCTGCGGTTCCAGAAAGCATTGGAGATGCACACTTAAAGAAGTGGGTGGTTGCT
GAACCTGAGACGAGAGTACTAGAACTGGAAACAAGATATGGAGTTTCTTTGCTTTAGCTTCTGATGGACTTTGGGATGTGGTT
AGCAATCAAGAAGCTGTTTATACCGTGTTCGATGTTCTAGCTCAGAGAAAAGACGCTTAAAGAAAGTGAGGAGGAGAACTTG
GTTACAGGGCTTTGTCAATATGAGCCCATCTTCGAAACTTCGTCGAGCTTCACTGGTCAAGTCTCCAGATGTGCTAAATCC
CAAAGTTACTACTACAACCTCAGAGAATGAATCACCTCCTCAACCGTGAATAGGGAGTTCACCTTCAAAGTACCCGATA
ACACCGTGAAGTCTCTTTGGGCCAAAGCGCTTGCAAAGAGCTTGCGAACCTGGCTGCAAAAAGAGGCAGTATGGATGAT
ATCACAGTGGTGATAATTGATCTCAACCATTACAAAGGCTGA

B

CDS CaS laut TAIR

ATGGCTATGGCGAAATGGCAACGAAGTCTTCACTATCTGCAAAACTCACTCTTCCTTCTTCTACTAAGAAGACACTG
AGTCTGAGACAAGTCTCTGTTTCACTTCCAACATCAACTTCAATCTCTCTGTTATCTCTCTTTGCATCTCCTCCTCATGAA
GCTAAAGCTGCTGTTTCCATTTCCCAAGGACCAAATCGTCTCCTCTCACTGAAGTGGAGAAAAAACAATCAACCAAGTTCAA
GAAACTGGTTCTAGTGTATTTGATGCAACGCAGCGTGTGTTCCAAGTAGTAGGAGATGCTCTTAAACCAGCTTTGGACACT
GCTTTACCCATTGCAAAGCAAGCTGGTGAAGAAGCTATGAAGCTTGCTTCTCCTGCTTTCTCTGAAGCTTCAAAGAAAGCT
CAAGAAGCAATGCAGAGCTCTGGTTTTGATTCTGAGCCTGTCTTTAATGCTGCAAAGACAGTAAACAGATGTAGCACAAACAG
ACGTCAAAGCGATAGAAGATGCTAAACCGATTGCTTCATCGACCATGGATACGATTTCTTACGCTGACCCTAGTGTCAATT
GTTGTTGCTGCTGGTGTGCGTTTTCTTGCTTACCTTCTTCCCTCCTGTTTTCTCTGCCATCTTTTTAACTTCCGTGGT
TACAAAGGTGATCTTACGCCGGCTCAAACGCTTGACCTTCTTTGCACCAAGAAGTACTTATGATGGTGGATATAAGATCAGAG
AAAGACAAGGAGAAAGCCGGGATTCCACGGCTCCCTTCGAATGCTAAGAACCAGCGTGATCTCCATTCCATTAGAAGAACTA
CCAAACAAAGTAAAGGAATCGTGAGGAACCTTAAACGAGTTGAAGCAGAGATAGCAGCATTAAAGATTTCTTACCTCAAG
AAAATCAACAAAGGCTCCAATATCATCATCTTGGACTCGTACACGGATTCCGGTAAAGATAGTGGCGAAAACGTTAAAGGTT
CTCGGTACAAGAATTGCTATATTGTGACAGATGGATTCTCTGGTGGCAGAGGATGGTTGCAGAGCCGTTTAGGCACTGAT
TCTTACAACCTCTCGTTTTGCACAAGTCTTGTCTCCATCGCGGATTATCCCAGCAGCTTCGAGAAGCTTTGGCACTAGGTCC
GGAACCAAGTCTTCTTAGCTCCGACTGA

C

CDS Cys laut TAIR

ATGATGATGAAGTCGTTGATCTGTCTCTCTCATCCTCCTCCCACTTGTCTCCGTCGTGGAAGGTCTCGGTGGTGGTGGT
GGTCTTGGTAGCCGGAAGCCGATCAAGAATGTATCTGATCCGGATGTTGTTGCGGTGCGCAAGTATGCCATCGAGGAACAT
AACAAGGAGTCAAGGAGAAAGTTGGTTTTCTGCAAGTTGTGGAGGGAACGACGCAAGTGGTCTCCGGTACAAGTACGAT
CTGAAAATTGCGGCGAAGGATGGTGGTGGTAAGATCAAGAAGTATGAGGCTGTTGTTGTTGAAAAGCTTTGGCTTCAATTCTA
AGAGCCTTGAGTCTTTCAAGGCGTTATAG

D

CDS Glyk laut NCBI

ATGCTGCTCTATTGCTGAAGAGAAAACAATGTGTGAGCTGCCATGTTTGTCTCTGGATGGGTATATGAGACTGCACAACAA
CCCAATTTTAAATTCGGCTCAGAATAAATGGTGGTCACTTGTGCGAGAAGTCATGTGGAATAGTCCAAACTATCCACAAGTCT

TCCCTTTTACTCGGATTTCAATCAGGGCTTTGGTTACCATGTTTCACTCCAAGGTCTCCAACAGTCAGATTGTTGCTTTT
 AGTTTTATCTTACAGATGCCCATGGTGACATCAGATGAAACCTCTAAACATGGAATCCTGCTTTCTTTCTCATCTCCA
 TCACACGAGACGAAATCCATCTCTGTTTACGACAAGAATCCATCTGTAGATTCAACAACATGTTCTTACAGTGTCTCGCC
 ACGTCAGCGCAGACTGTATCCGAGTGGACAGTACAGGAGACAAGCCTTGTCTGGATGATCATGTTTCAGTACCAGCAGAAA
 CCCGAGACTTTACTTCCGGCATCACCGTTGGTCATTGAAGCTCATAACATGGAGCTTGTACCCGGTTATTCTGGTTCCAAG
 AGCCTCAGGGTTAAGCTAGAATGGAGACAGAAAAGACCTTGAAGATTCTGCATTCCAAGGTACAATGTGTATGCGGAGAAT
 GTAAAGTCTACTGATCTAAGACCGAGGAAGTTCTAGAGAAGCCGAGAAGCGAAAACAGTGTTTCTCGGAGTGCCTCACGTA
 CCATCCTATTACATAGCAGAACTGGTGGTAGAATCAGACGTGAAAGGAGTCCGCTTTGTGTTCAAGCCTGTGCTAAAGATG
 CTACGATTCACCTTATCATGGTGGGGCTGGTCCGAATCGCAATTGTCAATTTCTGCTTTCAATGATTTTGTCTGTGGGAATC
 GACGTGGAGTACAATGTCTCCTATGTCTACCATGCCCTAGATGCCTACATCGAGAGAGACAATGTCCGGCTTGAAGGTTTC
 ACCAAGTTCTTTAACGATTCAAGTCTTGAAGAACGAGGTTATGCTGAGAAGTTTATGGAGTATCAGATGCATTGTTTGGGA
 TGGAGCTTGCACTGA

CDS Glyk laut TAIR (Sequenz nicht vollständig im ORF enthalten)

ATGCTGCTCTATTTGCTGAAGAGAAAACAATGTGTCAGCTGCCATGTTTGTCTCCTGGATGGGTATATGAGACTGCACAACAA
 CCCAATTTTAATTCGGCTCAGAATAAATGGTGGTCACTTGTGCGAGAAGTCAATGTGGAATAGTCCAAAATATCCACAAGTCT
 TCCCTTTTACTCGGATTTCAATCAGGGCTTTGGTTACCATGTTTCACTCCAAGGTCTCCAACAGTCAGATTGTTGCTTTT
 AGTTTTATCTTACAGATGCCCATGTTGATCTTCTTGATCTGGGGTCTCTCTCCTCTCATCTGATCTCCGCTTTTTCT
 GATAGTACTCGAGAGGCATCTTTTAAACGGAGGAGACTACATCACTTTTAGAGGAAAACCTCGAGGGAGATGCGTATTTACA
 ACAAGGCTCTTCAAATCCCATCTTCATCTTTTCATCTTCCCCATCACAATTTCTTCTCTGTGACATCAGATGAAACCTCT
 AAACATGGAATCCTGCTTTCTTCTCATCTCCATCACACGAGACGAAATCCATTTCTGTTTACGACAAGAATCCATCTGT
 AGATTCAACAACATGTTCTTACAGTGTCTCGCCACGTGAGCGCAGACTGTATCCGAGTGGACAGTACAGGAGACAAGCCTT
 GTCCTGGATGATCATGTTTCAGTACCAGCAGAAAACCCGAGACTTTACTTCCGGCATCACCGTTGGTCATTGAAGCTCATAAC
 ATGGAGCTTGTACCCGGTTATTCTGGTTCCAAGAGCCTCAGGGTTAAGCTAGAATGGAGACAGAAAAGACCTTGAAGATTCT
 GCATTCCAAGGTACAATGTGTATGCGGAGAATGTAAAGTCTACTGATCTAAGACCGAGGAAGTTCTAGAGAAGCCGAGA
 AGCGAAACAGTGTCTTCCGAGTGCCTCACGTACCATCTATTACATAGCAGAACTGGTGGTAGAATCAGACGTGAAAGGA
 GTCGCTTTGTGTTCAAGCCTGTGCTAAAGATGCTACGATTCACCTTATCATGGTGGGGCTGGTCCGAATCGCAATGTGAT
 TTCTTGCTTTCAATGATTTTGTCTGTGGGAATCGACGTGGAGTACAATGTCTCCTATGTCTACCATGCCCTAGATGCCTAC
 ATCGAGAGAGACAATGTCCGGCTTGAAGTTTATGGAGTATCAGATGCATTGTTTGGGATGGAGCTTGCACTGACTTTGGAG
 AAACCTTATTAATGAAAAGCTTCTGAAGTTACAAAGTGTGGTGTGAAGAACAATGATGTTAAGCTGGTTGATTTGTAGAA
 TCTGAGTTTCTAGCGGAGCTGGTCAAGCCATCAAGAAAATCTCAGAGTACATAGATGGAACAAAATAAGGTCAATGCAG
 TGGTGA

Tabelle 6-1: Oligonukleotide für Restriktionsklonierungen. Verwendung siehe 2.2.3.

Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5´-3´) Restriktionsschnittstellen klein	Annealing- Temperatur
CPK28 fwd <i>HindIII</i>	GGaagcttATGGGTGTCTGTTTC	56 °C
CPK28- VK rev <i>SmaI</i>	cccgggATTCCCGCCTTCTC	
PP2C- fwd <i>EcoRI</i>	AAgaattcATGACTAATAAACTTCGCTCAGAAG	56 °C
PP2C rev <i>BamHI</i>	AAggatccTCAGCCTTTGTAATGGTTGAGATC	
CaS fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGGCTATGGCGGAAATGGC	56 °C
CaS rev <i>SmaI</i>	AAcccgggGTCGGAGCTAGGAAGGAACTTGG	
Cys fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGATGATGAAGTCGTTGATCTGTC	56 °C
Cys rev <i>SmaI</i>	AAcccgggTAACGCCTTGAAAGACTCAAGGC	
PP2C- fwd <i>SalI</i>	AAgtcgacATGACTAATAAACTTCGCTCAGAAG	56 °C
PP2C rev <i>XhoI</i>	AAactcgagTCAGCCTTTGTAATGGTTGAG	
CaS fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGGCTATGGCGGAAATGGC	56 °C
CaS rev <i>SmaI</i>	AAcccgggGTCGGAGCTAGGAAGGAACTTGG	
Cys fwd <i>Clal</i>	AAatcgatATGATGATGAAGTCGTTGATCTGTC	56 °C
CaS rev <i>SmaI</i>	AAcccgggTAACGCCTTGAAAGACTCAAGGC	
CPK28 fwd <i>XbaI</i>	GCActagaATGGGTGTCTGTTTCTCCGCC	56 °C
CPK28 rev <i>SmaI</i>	TAcccgggTCGAAGATTCTGTGACCTGCA	

Tabelle 6-2: Mutagenese-Oligonukleotide. Verwendung siehe 2.2.3.

Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5'-3') (Mutation fettgedruckt)	Annealing-Temperatur
CPK28 S228A fwd	CCATGACATTGTTGGT G CCGCCTATTATGTGG	60 °C
CPK28 S228A rev	CCACATAATAGGCG G CACCAACAATGTCATGG	
CPK28 S228D fwd	CCATGACATTGTTGGT G ACGCCTATTATGTGG	60 °C
CPK28 S228D rev	CCACATAATAGGCG T CACCAACAATGTCATGG	
CPK28 S318A fwd	CTGCTGCACAAGCACTAG G CACATGCGTGGGTTAGAG	60 °C
CPK28 S318A rev	CTCTAACCCACGCATGT G CTAGTGCTTGTGCAGCAG	
CPK28 S318D fwd	CTGCTGCACAAGCACTAG G ACCATGCGTGGGTTAGAG	60 °C
CPK28 S318D rev	CTCTAACCCACGCATG T CTAGTGCTTGTGCAGCAG	
CPK28 S495A fwd	GAGATGGGAAAATAG C CCTGCATGAGTTCAG	60 °C
CPK28 S495A rev	CTGAACCTCATGCAGG G CTATTTTCCCATCTC	
CPK28 S495D fwd	GAGATGGGAAAATAG A CCTGCATGAGTTCAG	60 °C
CPK28 S495D rev	CTGAACCTCATGCAG T CTATTTTCCCATCTC	
CPK28 G2A fwd	CCCTTCACCATGG C TGTCTGTTTCTCCG	60 °C
CPK28 G2A rev	CGGAGAAACAGAC A GCCATGGTGAAGGG	

Tabelle 6-3: Oligonukleotide für Insertionsnachweis in *cpk28-1* bzw. *cpk28-2* per Sequenzierung

Oligonukleotid Bezeichnung	Nachweis	Oligonukleotid Sequenz (5'-3') (Mutation fettgedruckt)	Annealing Temp	Produktlänge in bp
CPK28 #1841	<i>cpk28-1</i> LB Insertion	CCACTAACCCATCAGTGTTC	56 °C	643
GABI-KAT-LB		ATATTGACCATCATACTCATTGC		
CPK28 #531	<i>cpk28-1</i> RB Insertion	AAGGTTCCATGACATTGTTG	56 °C	695
GABI-KAT-RB		GTGGATTGATGTGATATCTCC		
CPK28 #143	<i>cpk28-2</i> LB Insertion	TCGAAGATTCCTGTGACCTGCAG	56 °C	504
GABI-KAT-LB		ATATTGACCATCATACTCATTGC		
CPK28 #382	<i>cpk28-2</i> RB Insertion	CACATGCGTGGGTTAGAGAAGG	56 °C	760
GABI-KAT-RB		GTGGATTGATGTGATATCTCC		

Tabelle 6-4: Genotypisierungs-Oligonukleotide

Oligonukleotid Bezeichnung	Nachweis	Oligonukleotid Sequenz (5'-3')	Annealing Temp	Produktlänge in bp
CPK28 fwd	CPK28 WT	AAGGTTCCATGACATTGTTG	56 °C	1217
CPK28 rev		CATTCGAAGTTCCTCAGGCGTTATG		
GABI-KAT-LB	T-DNA in <i>cpk28</i> (beide Linien)	ATATTGACCATCATACTCATTGC	56 °C	767 für <i>cpk28-1</i> , 231 für <i>cpk28-2</i>
CPK28 rev		CATTCGAAGTTCCTCAGGCGTTATG		
PP2C fwd	PP2C WT	AGGGGCTTGGCGAGTTCAGG	56 °C	ca. 600
PP2C rev (Klonierungsprimer)		aaggatccTCAGCCTTTGTAATGGTTGA GATC		
SALK-LB	T-DNA in <i>pp2c</i>	TGGTTCACGTAGTGGGCCATC	59 °C	ca. 600
PP2C rev		aaggatccTCAGCCTTTGTAATGGTTGA GATC		
AOS fwd	AOS WT	CTAACCGGAGGCTACCGTATC	56 °C	1095
AOS rev		CGAGAAATTAACGGAGCTTCC		
SALK-LB neu	T-DNA in <i>aos</i>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	56 °C	ca. 700
AOS fwd		CTAACCGGAGGCTACCGTATC		
COI1-16 P2	COI1 WT	GAACACAATTTAGTACTAAGGACGC ATTCCCAA	68 °C	340
COI1-16 P4		AACTAGTTGGGTTCTTTAAGGCTGC AGCTATTC		
COI1-16 P2	<i>coi1-16</i> (EMS Mutation)	GAACACAATTTAGTACTAAGGACGC ATTCCCAA	68 °C	340
COI1-16 P3		AACTAGTTGGGTTCTTTAAGGCTGC AGCTAACT		

Tabelle 6-5: Oligonukleotide für semi-quantitative RT-PCR

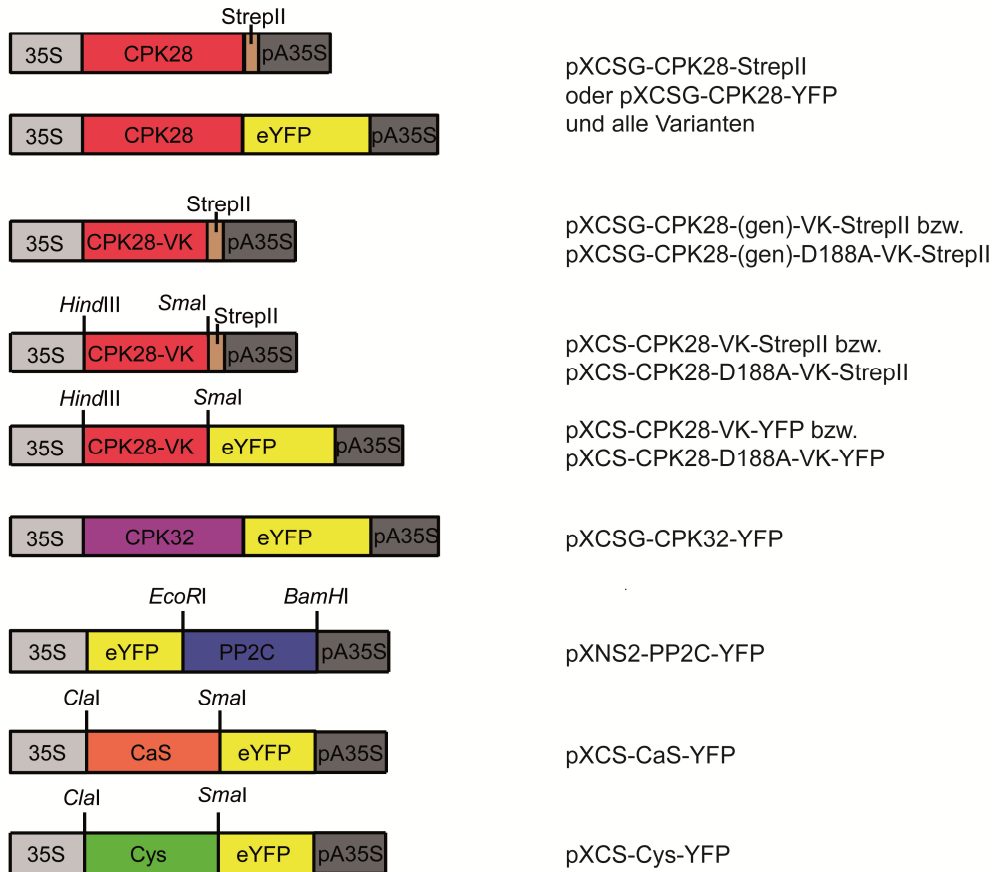
Oligo-nukleotid Bezeichnung	Nachweis	Oligonukleotid Sequenz (5'-3')	Annealing Temperatur	Produktlänge in bp
Actin2 fwd	Referenzgen ACTIN2	GTGAACGATTCTGGACCTGCCTC	56 °C	528
Actin2 fwd		GAGAGGTTACATGTTCCACCACAAC		
CPK28 #531	CPK28 vor Insertion	AAGGTTCCATGACATTGTTG	52 °C	319
CPK28 #3045		CCCGCCTTCTCTAACCCACGC		
CPK28 1439	CPK28 nach Insertion	GATAGCAACACTGATGGGTTAGTG	52 °C	308
CPK28 #2774		GCAGGGCTTGGTGCTCTCTGTG		
CPK28 #531	CPK28 Insertion überspannend	AAGGTTCCATGACATTGTTG	52 °C	587
CPK28 #1841		CCACTAACCCATCAGTGTTC		

Tabelle 6-6: Oligonukleotide für qRT-PCR. F = fwd-Oligonukleotid, R = rev-Oligonukleotid

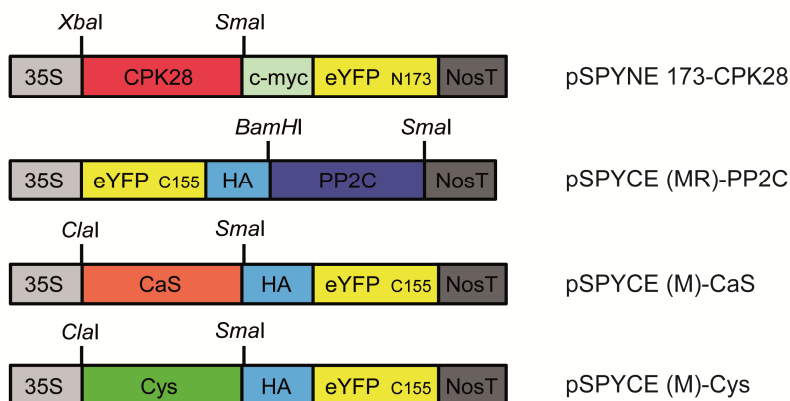
Oligonukleotid Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz (5'-3')	Beschreibung	Annealing-Temperatur
qRT-Actin2-F	TCCCTCAGCACATTCCAGCAGAT	Amplifikation Referenz ACTIN2	60 °C
qRT-Actin2-R	AACGATTCTGGACCTGCCTCATC		
qRT-NST1-F	TCGAGCCTTGGGACATTCAAGAGA	Amplifikation NST1	60 °C
qRT-NST1-R	ACCAGTCGTTTTGTGGCGTTGTT		
qRT-NST2-F	GCTCTTGAAGTATTACCTCCGCAA	Amplifikation NST2	60 °C
qRT-NST2-R	ATCTCTTGAATATCCCAAGGCTCG		
qRT-NST3-F	GTGCCTCCAGGTTTCAGATTCC	Amplifikation NST3	60 °C
qRT-NST3-R	TCCTCTTGAATATCCCAAGGCTCA		
qRT-GA20ox1-F	AGTGACGCCACCGAGAGAGCT	Amplifikation GA20ox1	60 °C
qRT-GA20ox1-R	GGTGAGCCAATCTGAAAAGGCTTGG		
qRT-GA3ox1-F	ACCGTGCCACCGTTTCCTGG	Amplifikation GA3ox1	60 °C
qRT-GA3ox1-R	TAACCCGAGCGCGGTGCAAC		
qRT-CPK28-F	GCGTGGGTTAGAGAAGGCGGG	Amplifikation CPK28	58 °C
qRT-CPK28-R	AGTGTGCTAGCAAGCGCCCT		
qRT-PP2C-F	AGGGGCTTGGCGAGTTCAGG	Amplifikation PP2C	60 °C
qRT-PP2C-R	TCGTCTCAGGTTTACGCAACCACC		
qRT-PDF1.2-F	CTTTCGACGCACCGGCAATG	Amplifikation PDF1.2	60 °C
qRT-PDF1.2-R	TCCGCAAACCCCTGACCATG		
qRT-CORI3-F	GAGGCGGCCAAAGATGCT	Amplifikation CORI3	60 °C
qRT-CORI3-R	CAGGGCATAGAGTGCAGAGGTA		
qRT-VSP2-F	TCCATCAACTACGCCAACTG	Amplifikation VSP2	60 °C
qRT-VSP2-R	CGGTTTTGGAGTCGTATTGG		
qRT-AOS-F	GAACCACCGTTACGGCTCA	Amplifikation AOS	60 °C
qRT-AOS-R	ACTTTAAACGCCGCGTCGTG		
qRT-OPR3-F	GGTGTTAATGGCTCAAAGCTCGC	Amplifikation OPR3	60 °C
qRT-OPR3-R	CTCTGTTTGCCCGTAGGCGT		
qRT-JAZ1-F	AACTTGCGGAGCAAAGGCAC	Amplifikation JAZ1	60 °C
qRT-JAZ1-R	TGGATGAGGAACTTGGTTTGCGA		
qRT-JAZ10-F	ATGTCGAAAGCTACCATAGAAGCTCG	Amplifikation JAZ10	60 °C
qRT-JAZ10-R	GCCGATGAATCGGAATTGTTTCCAGTGG		

Abbildung 6-3: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte (nicht maßstabsgetreu). 35S: 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus'. PP2C: Protein Phosphatase 2 C, CaS: Calcium Sensing Receptor, Cys: Cystatin/Monellin Superfamily Protein, eYFP: Yellow Fluorescence Protein, HA: Hämagglutinin-Epitop, c-myc: c-myc-Epitop, GST: Glutathion-S-Transferase, pA35S: Terminator des 35S-Promotors, NosT: Terminator des *Nos*-Gens. Dargestellt sind die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Pflanzenexpressionskonstrukte:



BiFC-Konstrukte:



E. coli-Expressionskonstrukt:

