

Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

Charakterisierung der calciumabhängigen Proteinkinase GCA2
aus *Arabidopsis thaliana*

Christian Wellmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 27.11.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.01.2013 angenommen.

Für alle, die mir am Herzen liegen.

Inhalt

Inhalt

Inhalt.....	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Abscisinsäure.....	5
1.1.1. Biosynthese und Abbau von Abscisinsäure.....	6
1.1.2. Signaltransduktion.....	8
1.1.3. Stomataregulation	14
1.2. Calcium	17
1.2.1. Calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs)	19
1.3. GCA2	22
1.4. Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Verwendete Mikroorganismen und ihre Kultivierung.....	26
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung.....	26
2.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme und ihre Kultivierung	26
2.1.3. Antibiotika	26
2.1.4. Herstellung kompetenter Zellen.....	27
2.1.5. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	27
2.2. Molekularbiologische Methoden DNA & RNA.....	28
2.2.1. Methoden zur DNA-Isolation aus Mikroorganismen.....	28
2.2.2. Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.4. Kolonie-PCR	31
2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.6. Methoden zur Aufreinigung von DNA	32

Inhalt

2.2.7. Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	32
2.2.8. Modifikation von DNA-Enden	33
2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.10. Zielgerichtete Mutagenese.....	33
2.2.11. Isolation von RNA aus <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	34
2.2.12. Erzeugung von cDNA aus RNA durch reverse Transkription	34
2.2.13. DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.14. Klonierungsstrategien	35
2.3. Proteinbiochemische Methoden	36
2.3.1. Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	36
2.3.1. Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	36
2.3.2. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	38
2.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	39
2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.3.5. Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	43
2.3.6. Western-Blot	43
2.3.7. Immunologischer Nachweis.....	44
2.3.8. Antikörper.....	44
2.3.9. Fällung proteinhaltiger Lösungen	45
2.3.10. Herstellung von dephosphoryliertem Casein.....	45
2.3.11. Kinaseaktivitätstest	45
2.3.12. Autoradiographie	47
2.3.13. Szintillationsmessung	47
2.3.14. Phosphorylierung rekombinant exprimierter Proteine.....	47
2.3.15. Isotherme Titrationskalorimetrie.....	48
2.3.16. Phosphataseaktivitätstests	48
2.4. Physiologische Methoden.....	50
2.4.1. Anzucht von <i>A. thaliana</i> in Erde	50
2.4.2. Anzucht von <i>A. thaliana</i> in Sterilkultur	50
2.4.3. EMS-Mutagenese	51

Inhalt

2.4.4. Keimungsversuche.....	52
2.4.5. Wurzelwachstumsversuche.....	52
2.4.6. Präparation von <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	52
2.4.7. Transfektion von <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten mit Plasmid-DNA	53
2.4.8. Reporteraktivitätsmessung.....	54
2.5. Geräte und Chemikalien.....	55
2.5.1. Geräte.....	55
2.5.2. Chemikalien und Reagenzien.....	56
2.5.3. <i>In silico</i> -Analyse	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1. Suppressoren der <i>gca2-1</i> -Mutation	58
3.1.1. EMS-Screen.....	58
3.1.2. Analyse der potentiellen Suppressoren des ersten Screens.....	59
3.1.3. Charakterisierung der potentiellen Suppressoren des zweiten Screens	61
3.2. Funktionelle Charakterisierung von GCA2.....	65
3.2.1. Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	65
3.2.2. Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die Kinaseaktivität	66
3.2.3. Charakterisierung der Calciumbindung mittels ITC.....	70
3.2.4. Regulation der Kinaseaktivität durch RCAR1	72
3.2.5. Analyse der Phosphorylierung möglicher Substrate	73
3.2.6. Interaktion mit OST1 <i>in vitro</i>	76
3.3. Massenspektrometrische Phosphorylierungsanalyse	79
3.3.1. Substratphosphorylierung durch GCA2.....	79
3.3.2. GCA2-Autophosphorylierung und Phosphorylierung durch OST1	82
3.4. Auswirkungen der Phosphorylierung auf die Substrate	84
3.4.1. ABI2.....	84
3.4.2. ABF1.....	88
3.5. Phosphoregulation von GCA2.....	89
3.5.1. Autophosphorylierung	89
3.5.2. Phosphorylierung von GCA2 durch OST1.....	91

Inhalt

4.Diskussion	97
4.1.Ist GCA2 eine calciumabhängige Proteinkinase?	97
4.2.Wird GCA2 durch Phosphorylierung reguliert?	103
4.3.Welche Rolle spielt die Kinaseaktivität von GCA2?	110
4.4.Welche zusätzlichen Faktoren interagieren mit GCA2?	117
5.Literaturverzeichnis	118
Anhang	i
Oligonukleotide	i
Danksagung	iv

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Prozent (Gewicht pro Volumen)
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
³² P	radioaktives Phosphorisotop Phosphor-32
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A.thaliana</i> / <i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure
ABA1-4 / <i>aba1-4</i>	ABA-deficient, Enzyme die an der ABA-Synthese beteiligt sind bzw. korrespondierende Mutanten
ABF	<i>ABA-responsive element binding factor</i>
ABI / <i>abi</i>	ABA-insensitiv
ABRE	<i>ABA-responsive element</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AHG	<i>ABA-hypersensitive germination</i>
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AREB	<i>ABA-response element binding protein</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
CAD	CDPK-aktivierende Domäne
cADPR	cyclische ADP-Ribose
CaM	Calmodulin
CAP	<i>cleaved amplified polymorphism</i>
CBL	calcineurin B-like protein
CCaMK	Calcium- und Calmodulinabhängige Proteinkinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDPK	Calciumabhängige Proteinkinase
CDS	kodierende Sequenz (<i>coding sequenz</i>)
CE	<i>coupling element</i>
Ci	Curie
CIPK	<i>CBL-interacting protein kinase</i>
CLD	Calmodulinartige Domäne

Abkürzungsverzeichnis

Col	<i>A. Thaliana</i> Ökotyp <i>Columbia</i>
CPK	Calciumabhängige Proteinkinase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiathreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-Hand	konserviertes Calciumbindemotiv in Proteinen
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
EMS	Methansulfonsäureethylester
ERA	<i>enhanced response to ABA</i>
g	Erdbeschleunigung ($1\text{g} = 9,81\text{ ms}^{-2}$) bzw. Gramm
GCA / gca	<i>Growth control by ABA</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GHR	<i>guard cell hydrogen peroxide-resistant</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GUN5/CHLH/ABAR	<i>Genomes uncoupled 5 / H-subunit of magnesium chelatase</i>
GUS	β -D-Glucuronidase
h	Stunde
HAB	<i>hypersensitive to ABA</i>
HAI	<i>highly ABA-induced</i>
IP ₃	myo-Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP ₆	myo-Inositol-Hexakisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
K _d	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Bakteriennährlösung
Ler	<i>A. Thaliana</i> Ökotyp <i>Landsberg erecta</i>
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
LUC	Luciferase
M	molar, mol/l
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
min	Minute
mM	millimolar
mmol	Millimol
mol	chemische Einheit der Stoffmenge
mQ	milliQ-Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Murashige und Skoog-Pflanzennährmedium
MUG/MUP	Methylumbelliferyl-glucuronid/-phosphat
nM	nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
OST1	<i>open stomata 1</i>
PA	Phosphatidsäure
PP2C	Proteinphosphatase Typ 2C
PYR1/PYL	<i>Pyrabactin-Resistance 1 / PYR1-Like</i>
Rboh	<i>respiratory-burst oxidase homolog</i>
RCAR	<i>Regulatory Component of ABA Receptor</i>
Rif	Rifampicin
RLK	<i>receptor-like kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCS	<i>SnRK2-interacting calcium sensor</i>
SLAC1/SLAH	<i>Slow anion-channel associated / SLAC1 homologue</i>
SnRK	<i>Sucrose-non-fermenting 1-related protein kinase</i>
SOS	<i>salt overly sensitive</i>
SSLP	<i>simple sequence length polymorphism</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Phytohormone und ihre Wirkung	5
Abb. 1-2 Biosynthese von Abscisinsäure	7
Abb. 1-3 Die RCAR/PYR/PYL-Familie in Arabidopsis	10
Abb. 1-4 Die Untergruppe A der PP2C-Familie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
Abb. 1-5 Übersicht der CPK-Genfamilie in Arabidopsis	20
Abb. 1-6 Schematische Darstellung der Aktivierung einer CDPK.....	21
Abb. 3-1 ABA-Sensitivität des Wurzelwachstums der Suppressor-Kandidaten aus dem ersten Screen	59
Abb. 3-2 Keimung der potentiellen Suppressorlinien.....	60
Abb. 3-3 <i>sup6</i> und <i>sup10</i> im Vergleich mit Landsberg <i>erecta</i> und <i>gca2-1</i>	61
Abb. 3-4 Genotypisierung der Suppressorkandidaten.....	62
Abb. 3-5 Inhibierung des Wurzelwachstums der Suppressorkandidaten durch ABA.....	63
Abb. 3-6 Einfluss von ABA auf die Keimung der Suppressorkandidaten.....	63
Abb. 3-7 GCA2-Versionen	65
Abb. 3-8 Calciumabhängigkeit der Aktivität von GCA2	67
Abb. 3-9 Vergleich der Aktivierung von GCA2 und CPK3	67
Abb. 3-10 Calciumabhängige Aktivierung von CPK21	68
Abb. 3-11 Vergleich der absoluten Aktivität verschiedener CPKs	69
Abb. 3-12 ITC-Daten zur Bindung von Ca ²⁺ an GCA2.....	70
Abb. 3-13 Kinaseaktivität von GCA2-EF-Hand-Mutanten.....	72
Abb. 3-14 Einfluss von RCAR1 auf die Kinaseaktivität von GCA2	73
Abb. 3-15 Phosphorylierung von RCAR-Proteinen	74
Abb. 3-16 Phosphorylierung verschiedener PP2Cs durch GCA2.....	75
Abb. 3-17 Test auf Phosphorylierung von ABF1 und ABR1 durch GCA2.....	76
Abb. 3-18 Einfluss von GCA2 auf RCAR3 und OST1	77
Abb. 3-19 Phosphorylierung von GCA2 durch OST1	78
Abb. 3-20 Inaktivierung von OST1 durch GCA2.....	78
Abb. 3-21 Phosphorylierungsstellen in ABI2	80
Abb. 3-22 Phosphorylierung verschiedener ABI2-Varianten	81
Abb. 3-23 Phosphorylierungsstellen in ABF1	81
Abb. 3-24 Phosphorylierung von ABF1-Peptiden.....	82
Abb. 3-25 Phosphorylierungsstellen in GCA2	83
Abb. 3-26 Phosphataseaktivität von ABI2-Mutanten	85
Abb. 3-27 Regulation der Aktivität verschiedener ABI2-Phosphomimic-Varianten	86
Abb. 3-28 Vergleich der ABA-Regulation von ABI2-WT, -S101A und -S101D	86
Abb. 3-29 Vergleich der ABA-Regulation von ABI2-WT, -S103A und -S103D	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-30 Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2 ^{S101/T200} -Doppelmutanten	88
Abb. 3-31 Transiente Expression von ABF1 in Arabidopsis-Protoplasten	88
Abb. 3-32 Autophosphorylierung von GCA2S362 und GCA2S365-Phosphomimic-Mutanten	90
Abb. 3-33 ABA-abhängige Regulation der Kinaseaktivität von GCA2 durch ABI2 und RCAR11 in vitro Autoradiogramm der Phosphorylierung des ABF1-basierten Peptids ABF1-dLYSL durch GCA2 in Gegenwart von RCAR11 und ABI2 mit und ohne 100 µM S-ABA sowie den entsprechenden Kontrollen für den Effekt der einzelnen Komponenten auf die Kinaseaktivität von GCA2. GCA2: 1 µM; Peptid: 1 µg; RCAR11: 5 µM; ABI2: 1 µM freies Calcium: >30 µM, 2mM MnCl ₂	92
Abb. 3-34 ABA-regulierte Phosphorylierung von GCA2 durch OST1 in vitro	93
Abb. 3-35 Aktivität von GCA2 ^{T317} -Mutanten gegenüber Casein	94
Abb. 3-36 Aktivität von GCA2 ^{T317} -Mutanten gegenüber einem ABF1-basierten Peptid ...	95
Abb. 3-37 Kinaseaktivität von GCA2 ^{T213A} im Vergleich zu GCA2-WT	96
Abb. 4-1 Vergleich der ersten EF-Hände von GCA2 mit dem klassischen EF-Hand-Motiv	100
Abb. 4-2 Koordination von Calcium durch EF-Hände	101
Abb. 4-3 Calciumoszillationen in <i>gca2-1</i> und Landsberg <i>erecta</i>	103
Abb. 4-4 Struktur der CLD von GCA2	105
Abb. 4-5 Sequenzalignment von OST1 und verschiedenen CPKs	107
Abb. 4-6 Vergleich der Kinasedomänen von OST1 und GCA2	108
Abb. 4-7 Schematische Darstellung der ABA-abhängigen Genregulation	113
Abb. 4-8 Struktur des ABA-Rezeptorkomplexes aus RCAR12 und ABI1	115
Abb. 4-9 Interaktion von GCA2 und RCAR1 (Daten von A. Korte)	116

Zusammenfassung

Die Fähigkeit zur Anpassung an veränderliche Umweltbedingungen und Stresssituationen wie Wassermangel oder Kälte ist eine Grundvoraussetzung für das Überleben einer Pflanze. Hierzu haben die Pflanzen sehr komplexe Signalübertragungsnetzwerke entwickelt, in denen das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) von zentraler Bedeutung ist, da es eine Vielzahl der zur Stressadaptation nötigen Prozesse kontrolliert. In früheren Studien wurde der *GCA2* (*Growth Control by ABA 2*)-Locus als wichtige Komponente des ABA-Signalübertragungsnetzwerks identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Calciumbindung der durch den *GCA2*-Locus codierten calciumabhängigen Proteinkinase mittels isothermaler Kalorimetrie charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass *GCA2* zwar Calciumionen bindet, aber nur eine geringe Aktivierung der Kinaseaktivität durch Calcium in Verbindung mit einer hohen Grundaktivität bei basalen Calciumkonzentrationen zeigt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass *GCA2* *in vitro* in der Lage ist zwei Typ-2C-Proteinphosphatasen (PP2Cs) der Untergruppe A, *ABI1* und *ABI2* (*ABA-Insensitive 1 und 2*), die *RCAR*-Proteine *RCAR9* und *RCAR11* (*Regulatory Component of ABA Receptor 9 und 11*) sowie auch den bZIP-Transkriptionsfaktor *ABF1* (*ABA-responsive element Binding Factor 1*) zu phosphorylieren. Die massenspektrometrische Analyse ergab je zwei Phosphorylierungsstellen in *ABI2* und *ABF1*. Die Phosphorylierung von *ABI2* zeigte allerdings keine Auswirkungen auf dessen Proteinphosphataseaktivität sowie deren ABA-abhängige Regulation durch *RCAR*-Proteine *in vitro*. Die Phosphorylierung von *ABF1* bewirkt eine leichte Reduktion dessen Aktivität wie in transienten Analysen mit Arabidosis-Mesophyll-Protoplasten belegt werden konnte. Weiterhin wurden vier Autophosphorylierungsstellen in *GCA2* identifiziert, darunter auch zwei Aminosäuren am Ende der autoinhibitorischen Domäne, welche aufgrund ihrer räumlichen Lage Einfluss auf die Stabilität der calciumgebundenen Konformation der regulatorischen Domäne nehmen können. Die Aktivität von *GCA2* wird durch PP2Cs und *RCAR*-Proteine ABA-abhängig reguliert. Der zugrundeliegende Mechanismus ist wahrscheinlich analog zum Mechanismus der Aktivierung der SnRK (*SNF1-related Protein Kinase*) *OST1* (*Open Stomata 1*), welcher auf der Unterdrückung der Kinaseaktivität durch PP2C-vermittelte Dephosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle Serin 175 in Abwesenheit von ABA beruht. Zusätzlich ist *OST1* in der Lage *GCA2* ABA-abhängig an mindestens drei Positionen in der Kinasedomäne spezifisch zu phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung des Threonins an Position 317 durch *OST1* kann *GCA2* inaktiviert werden, wie *in vitro* Studien zeigten. Ebenso ist *GCA2* *in vitro* in der Lage, die Kinaseaktivität von *OST1* zu unterdrücken, allerdings konnte eine Phosphorylierung von *OST1* durch *GCA2* nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Interaktionen kann ein Feedback-Mechanismus angenommen

Zusammenfassung

werden, bei dem sich OST1 und GCA2 nach ihrer ABA-induzierten Aktivierung gegenseitig negativ regulieren. Da GCA2 aber neben seiner Grundaktivität noch eine durch Calcium induzierbare Komponente aufweist, wäre somit eine Modulation der letztlich resultierenden Phosphorylierung der Zielproteine von GCA2 und OST1 durch die Integration von Calciumsignalen möglich. Durch Screening einer chemisch mutagenisierten *gca2-1*-Population konnten zudem zwei neue Suppressormutanten isoliert werden, welche trotz der *gca2-1*-Mutation ein normales Sprosswachstum in Verbindung mit einer normalisierten Reaktion auf ABA bei der Keimung zeigten und somit eine wichtige Grundlage für die weitere Charakterisierung der ABA-GCA2 Wechselwirkung darstellen.

Summary

The ability to cope with variable environmental conditions is a prerequisite for survival of plants: To combat abiotic stress such as imposed by water deficit or cold, plants have evolved highly complex signaling networks with the phytohormone abscisic acid (ABA) as central messenger controlling a vast number of processes required for stress-adaption. Previously the *GCA2* (*Growth Control by ABA 2*)-locus was identified as an important component of the ABA signaling network. In this work, isothermal calorimetry was used to determine the calcium binding properties of the calcium-dependent protein kinase encoded by the *GCA2*-locus. Even though *GCA2* is capable of binding calcium ions it shows little calcium-mediated increase of kinase activity but a high constitutive activity at basal levels of calcium. *GCA2* was shown *in vitro* to phosphorylate ABI1 and ABI2 (*ABA insensitive 1 and 2*) which are members of the clade A of type 2C protein phosphatases (PP2Cs), the RCAR proteins RCAR9 and RCAR11 (*regulatory component of ABA-receptors 9 and 11*) as well as the bZIP-family transcriptional regulator ABF1 (*ABA-responsive element binding factor 1*). Analyses of ABI2 and ABF1 by mass-spectrometry yielded two sites in each of these proteins, which were phosphorylated by *GCA2*. The phosphorylation of ABI2 showed no significant effect on its phosphatase activity or its ABA-dependent regulation by RCARs *in vitro*. The phosphomimic form of ABF1 showed slightly decreased activity compared to the unmodified form *in vivo* by using the *Arabidopsis* mesophyll protoplast system. In *GCA2* itself, four autophosphorylation sites were identified, including two sites at the junction of the autoinhibitory and calmodulin-like parts in the regulatory domain which can possibly influence the stability of the calcium-bound conformation. The activity of *GCA2* is regulated in an ABA-dependent manner by PP2Cs and RCARs, probably reflecting the mechanism controlling the activity of the SnRK (*SNF1-related Protein Kinase*) OST1 (*Open Stomata 1*) which is based on suppression of kinase activity by PP2C-mediated dephosphorylation of the autophosphorylation site serine 175 in absence of ABA. Furthermore, *GCA2* is phosphorylated by OST1 specifically at least at three sites in the kinase domain. OST1-mediated phosphorylation on threonine 317 leads to the inactivation of *GCA2 in vitro* while *GCA2* is able to suppress the activity of OST1 *in vitro*, which may point to a feedback mechanism controlling the phosphorylation of downstream targets. As *GCA2* shows a calcium-inducible component in its activity besides its calcium-independent activity, a modulation of target phosphorylation by *GCA2*-mediated integration of calcium signals into the OST1-pathway cannot be excluded.

In addition, two new suppressor mutants were isolated from a chemically mutagenized population of *gca2-1*-seeds, which show wild-type-like shoot growth as well as

Summary

normalized ABA-sensitivity in seed germination while still having the *gca2-1* mutation and therefore provide a promising basis for further elucidation of the ABA-GCA2 interaction.

1. Einleitung

1.1. Abscisinsäure

Als sessile Organismen sind Pflanzen nicht in der Lage, Umwelteinflüssen auszuweichen, weshalb sie vielfältige Mechanismen zur Adaption an wechselnde Umgebungsbedingungen und Stresssituationen entwickeln mussten. Die Grundlage für dieses sehr komplexe Netzwerk physiologischer Anpassungsmechanismen bilden die sogenannten Phytohormone, pflanzeneigene, niedermolekulare organische Verbindungen, welche nicht nur grundlegende Prozesse wie Wachstum und Entwicklung der Pflanze koordinieren, sondern auch deren Anpassung an die jeweiligen Umweltgegebenheiten wie beispielsweise Wasserverfügbarkeit, Licht, oder Nährstoffgehalt des Bodens. Weiterhin dienen Phytohormone auch zur Steuerung schneller Schutzreaktionen in Stresssituationen wie beispielsweise Trockenheit oder Schädlingsbefall. Sie sind bereits in sehr niedriger Konzentration aktiv und in der Lage, durch direkte oder indirekte Regulation der Genexpression externe Reize in die Entwicklung der Pflanze auf zellulärer Ebene zu integrieren.

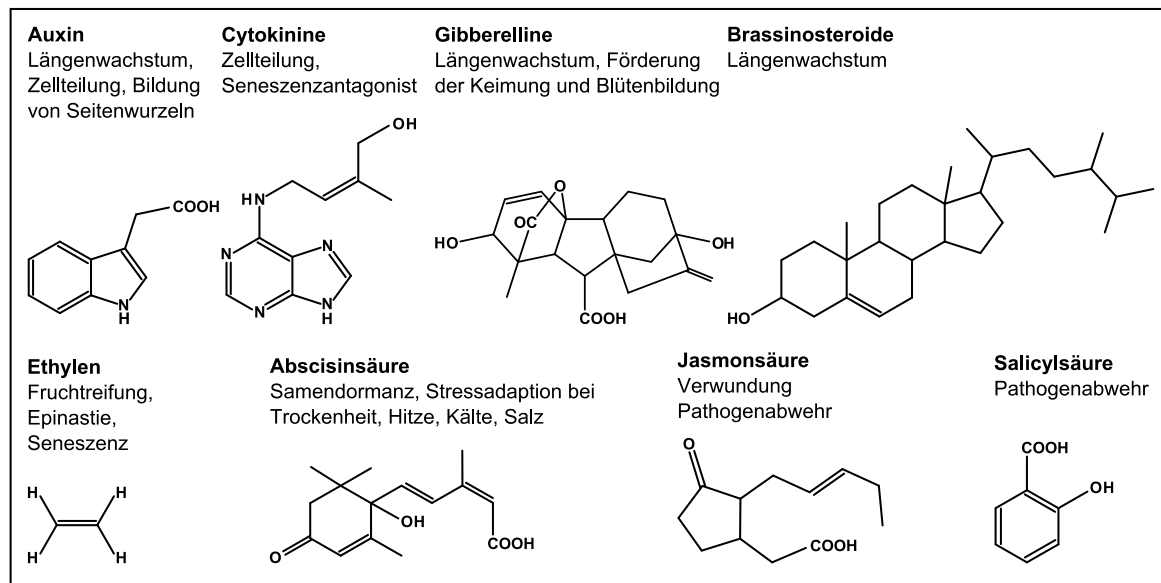


Abb. 1-1 Phytohormone und ihre Wirkung

Das Phytohormon Abscisinsäure (nach IUPAC-Nomenklatur: (S)-5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-cyclohex-2-en-1-yl)-3-methyl-cis,trans-penta-2,4-diensäure), ein monocyclisches Sesquiterpen, wurde nach seiner Entdeckung ursprünglich als Abscisin II (Ohkuma *et al.* 1963) oder Dormin (Cornforth *et al.* 1965) bezeichnet, wurde dann aber in Abscisinsäure (ABA) umbenannt als bekannt wurde, dass es auch an der Regulation weiterer physiologischer Prozesse beteiligt ist (Addicott *et al.* 1968). So werden neben zahlreichen Entwicklungsprozessen auch Adaptionsmechanismen in abiotischen (Zhu 2002; Hirayama und Shinozaki 2007) und biotischen (Adie *et al.* 2007; Fujita *et al.* 2006) Stresssituationen durch Abscisinsäure gesteuert.

Grundsätzlich lassen sich überwiegend wachstumsfördernde (Auxine, Cytokinine, Gibberelline, Brassinosteroide) und eher wachstumshemmende Phytohormone (Abscisinsäure, Ethylen, Jasmonsäure, Salicylsäure) unterscheiden (M. Iten 1999) (Abb. Hormone). Die Verteilung der Hormone innerhalb einer Pflanze erfolgt auf verschiedenen Transportwegen, so verteilt sich Ethylen über den Gasraum, während beispielsweise Auxine gerichtet von Zelle zu Zelle transportiert werden und die Verteilung von Cytokinin über das Leitungssystem erfolgt. Das Vorkommen von Abscisinsäure ist allerdings nicht auf Pflanzen beschränkt, so wurde beispielsweise gezeigt, dass sie auch menschlichen Granulozyten gebildet wird und dort die Funktion eines proinflammatorischen Cytokins erfüllt (Bruzzone *et al.* 2007).

1.1.1. Biosynthese und Abbau von Abscisinsäure

Die Biosynthese von Abscisinsäure erfolgt hauptsächlich in Schließzellen, Parenchymzellen des Leitgewebes sowie in der Wurzel (Christmann *et al.* 2005; Nambara und Marion-Poll 2005) über Xanthoxin aus Carotenoiden (Lichtenthaler *et al.* 1997; Rodriguez-Concepcion und Boronat 2002; Eisenreich *et al.* 2004). Die hierfür benötigten Carotenoide werden plastidär über den Methylerythritol-4-Phosphat-Weg ausgehend von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat über Isopentenylidiphosphat gebildet. Das so entstandene C₄₀-Carotenoid Zeaxanthin wird durch die Zeaxanthin-Epoxydase ABA1 in zwei Reaktionsschritten über die Zwischenstufe Antheraxanthin in All-*trans*-Violaxanthin umgewandelt (Barrero 2005), während die entsprechenden Rückreaktionen durch die Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) katalysiert werden. All-*trans*-Violaxanthin kann nun durch ABA4 zu All-*trans*-Neoxanthin umgewandelt werden (North *et al.* 2007). All-*trans*-Neoxanthin wird dann zu 9-*cis*-Neoxanthin konvertiert, welches durch die 9-*cis*-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED) oxidativ in Xanthoxin und eine C₂₅-Verbindung gespalten wird (Schwartz *et al.* 2001). Alternativ kann auch direkt All-*trans*-Violaxanthin in 9-*cis*-Violaxanthin konvertiert und durch die NCED gespalten werden. Xanthoxin wird dann ins Cytoplasma exportiert, wo es durch die Dehydrogenase/Reduktase ABA2 zu Abscisinaldehyd umgesetzt wird (Cheng 2002; Gonzalez-Guzman *et al.* 2002), welcher im letzten Schritt der Synthese durch die Abscisinaldehyd-Oxidase (AAO) zu Abscisinsäure oxidiert wird (Seo *et al.* 2000). Für die Funktion der AAO ist allerdings zusätzlich noch die durch ABA3 sulfurylierte Form eines Molybdän-Cofaktors erforderlich (Xiong *et al.* 2001).

Durch diesen Syntheseweg ist die Bildung von Abscisinsäure in Pflanzen unabhängig vom cytoplasmatischen Mevalonat-Biosyntheseweg, welcher beispielsweise in Pilzen zur Bildung von Sesquiterpenen dient. (Hirai *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2000)

Einleitung

Die Arabidopsis-Mutanten *aba1*, *aba2*, *aba3*, und *aba4* weisen alle ein Abscisinsäuredefizit auf, was zu einer reduzierten Dormanz der Samen und gestörter Stomataregulation führt. Diese Phänotypen lassen sich jedoch alle durch Supplementierung mit exogener Abscisinsäure aufheben.

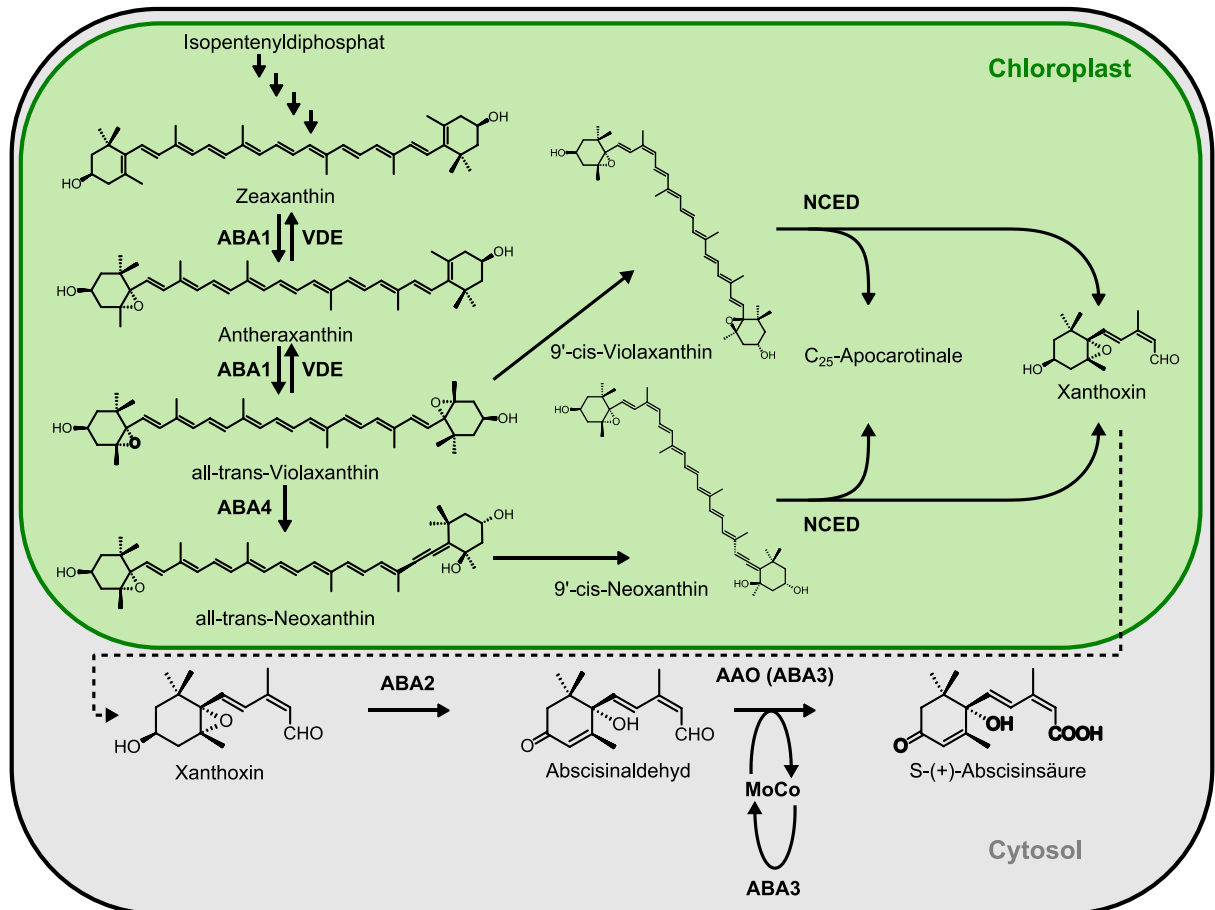


Abb. 1-2 Biosynthese von Abscisinsäure

Mit Isopentenylidiphosphat als Ausgangsstoff werden in den Chloroplasten C₄₀-Carotinoiden gebildet. Unter Beteiligung der Enzyme ABA1, ABA4 und NCED wird Zeaxanthin über Violaxanthin in die Abscisinsäurevorstufe Xanthoxin umgewandelt, welche dann ins Cytoplasma exportiert wird. Dort erfolgt dann die Bildung von Abscisinsäure durch Redoxreaktionen, welche durch ABA2 und AAO katalysiert werden.

Die Inaktivierung von Abscisinsäure kann auf zwei Verschiedene Arten erfolgen. Einerseits durch den oxidativen Abbau zu Phaseinsäure und Dehydrophaseinsäure durch die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP707A (Jadhav *et al.* 2008; Okamoto 2006; Saito 2004), andererseits mittels reversibler Konjugation zu Abscisinsäure-Glucoseester durch die ABA-Glycosyltransferase (Dietz 2000; Lee *et al.* 2006; Schroeder und Nambara 2006). Der Glucosester dient als inaktive Speicher- und Transportform für Abscisinsäure, welche bei Bedarf durch die β -Glucosidase AtBG1 wieder freigesetzt werden kann.

1.1.2. Signaltransduktion

Signaltransduktion bezeichnet die Summe aller Prozesse, die zur Umwandlung eines Stimulus oder Signals in eine physiologische Reaktion notwendig sind (Chory und Wu 2001). Abscisinsäure steuert, wie bereits erwähnt, zahlreiche Prozesse der Pflanzenentwicklung und Stressadaptation. So werden in frühen Stadien der Embryonalentwicklung das Wachstum und die Bildung von Speicherlipiden gefördert, während in späteren Stadien der Embryogenese, bei Vorliegen ungünstiger Wachstumsbedingungen, die Weiterentwicklung des Embryos durch ABA gehemmt wird, was mit einer Förderung der Samendormanz einhergeht, um eine Keimung unter ungünstigen Umweltbedingungen zu verhindern (Finkelstein *et al.* 2002; Nambara und Marion-Poll 2005). Weiterhin reguliert Abscisinsäure den Spaltöffnungsapparat um die Transpiration und somit den Wasserverlust der Pflanze an die Wasserverfügbarkeit anzupassen (Chinnusamy 2003; Schroeder *et al.* 2001a; Schroeder *et al.* 2001b; Christmann *et al.* 2006) und induziert unter Salzstress die Bildung osmoprotektiver Substanzen (Proteine und Metabolite) (Zhu 2002; Leung und Giraudat 1998; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 2000; Verslues *et al.* 2006). Ebenso führt ABA zur Aktivierung des Pflanzlichen Abwehrsystems bei biotischem Stress, wie beispielsweise Invasion durch ein Pathogen (Kaliff *et al.* 2007; Torres-Zabala *et al.* 2007; Anderson 2004; Melotto *et al.* 2006). Um all diese Funktionen erfüllen zu können, sind verschiedene, reaktionsspezifische Mechanismen zur Erkennung und Weiterleitung von Abscisinsäuresignalen notwendig. ABA muss in den jeweiligen Zellen durch einen Rezeptor erkannt werden und eine spezifische Signalkaskade aktivieren welche in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Zelltyp erheblich variieren kann (Finkelstein 2006). Für die Erkennung des ABA-Signals werden sowohl membranständige (Anderson *et al.* 1994; Jeannette *et al.* 1999) als auch cytoplasmatische (Levchenko *et al.* 2005) Perzeptionsorte diskutiert und es wurden verschiedene Kandidaten für ABA-Rezeptoren veröffentlicht (vgl. 1.1.2.1). Die anschließende Weiterleitung des Signals vom Rezeptor erfolgt durch Produktion bzw. Freisetzung intrazellulärer Botenstoffe (*second messenger*), sowie durch Proteinmodifikationen, vor allem Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmter Proteine und resultiert in einer physiologischen Reaktion wie beispielsweise Stomataschluss oder in einer Beeinflussung der Genexpression. Prinzipiell lassen sich die durch ABA ausgelösten Prozesse in schnelle Reaktionen wie z.B. das Schließen der Stomata (vgl.1.1.3) und langfristige Anpassungen unterteilen. Die der länger andauernden Anpassung der Pflanze dienenden Veränderungen werden über eine differenzielle Anpassung der Genexpression realisiert, wobei ca. 10 % aller Gene in *A. thaliana* einer Regulation durch Abscisinsäure unterliegen (Hoth *et al.* 2002; Nemhauser *et al.* 2006).

Einleitung

An der Übertragung von ABA-Signalen sind als *second-messenger* folgende Substanzen beteiligt: reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Stickstoffmonoxid (NO), cyclische-ADP-Ribose (cADPR), Inositol-Triphosphat (IP₃), Inositol-Hexaphosphat (IP₆), Diacylglycerolphosphat, Phosphatidsäure (PA) und Calciumionen (Ca²⁺) (Brault *et al.* 2004; Bright *et al.* 2006). Des Weiteren haben auch Faktoren wie der Redoxstatus und der cytosolische pH-Wert Einfluss auf die Signalübertragung. Auf die Rolle von Calcium in der intrazellulären Signaltransduktion soll in Abschnitt 1.2 genauer eingegangen werden. Bezüglich der Proteinmodifikation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind für die ABA-Signalübertragung vor allen Proteinkinasen aus Familie der SnRKs (*sucrose non-fermenting 1 related kinases*) (Mizoguchi *et al.* 2010) sowie CDPKs (*Calcium-Dependent Protein Kinases*) (Ludwig *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2007) und Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2Cs) (zusammengefasst in Fuchs *et al.* 2012) als Schlüsselkomponenten zu nennen.

1.1.2.1. Abscisinsäurerezeptoren in *A. thaliana*

Das erste als ABA-Rezeptor diskutierte Protein war FCA, welches eine Rolle in der Regulation der Blütezeit spielt (Razem *et al.* 2006), zwischenzeitlich wurde allerdings bewiesen, dass FCA entgegen der ursprünglichen Behauptung nicht in der Lage ist, ABA zu binden und somit nicht als Rezeptor in Frage kommt (Risk *et al.* 2008) und der ursprüngliche Artikel wurde von den Autoren zurückgezogen (Razem *et al.* 2008). Ein weiterer Kandidat, die im Chloroplasten lokalisierte H-Untereinheit der Magnesium-Protoporphyrin-IX-Chelatase (CHLH / ABAR / GUN5), die sowohl an der Chlorophyll-Biosynthese als auch an der retrograden Signalübertragung zwischen Chloroplast und Zellkern in Stresssituationen beteiligt ist, weist tatsächlich eine hochaffine ABA-Bindung auf (Shen *et al.* 2006), und die ABA-insensitiven bzw. hypersensitiven Phänotypen von RNAi-*knockdown*-Pflanzen bzw. ABAR überexprimierenden Pflanzen bestätigen eine Rolle des Proteins in der Übertragung von Abscisinsäuresignalen. Es wurde auch gezeigt, dass der cytosolische C-Terminus mit WRKY-Transkriptionsfaktoren interagiert, welche negative Regulatoren der ABA-induzierten Genexpression sind (Shang *et al.* 2010). So ist ABAR in der Lage, die Expression des Transkriptionsfaktors AD1A zu unterdrücken und so dessen inhibierenden Effekt auf die Expression von ABI5 und anderen ABA-induzierten Genen aufzuheben.

Ebenfalls als ABA-Rezeptor diskutiert wurde das membranlokalisierte GCR2, für welches eine Strukturhomologie zur Familie der *G-Protein-Coupled-Receptors* sowie die Fähigkeit zur ABA-Bindung postuliert wurden (Liu *et al.* 2007). Charakteristisch für diese Familie von Rezeptorproteinen ist die Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen, in diesem Fall

Einleitung

wurde die Interaktion mit der α -Untereinheit GPA1 gezeigt, welche tatsächlich eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion spielt (Wang *et al.* 2001; Pandey 2004; Wang *et al.* 2001). Allerdings konnte gezeigt werden, dass GCR2 nicht die postulierte Struktur eines G-Proteingekoppelten Rezeptors mit sieben Transmembranhelices aufweist und dass es nicht in der Lage ist, Abscisinsäure zu binden (Gao *et al.* 2007; Johnston *et al.* 2007). Allerdings wurde weiterhin im Bereich der Interaktionspartner von GPA 1 nach potentiellen ABA-Rezeptoren gesucht, was zur Identifizierung von zwei ABA-bindenden, membranlokalisierten Proteinen, GTG1 und GTG2 führte, welche sowohl Nukleotidbindende als auch GTPase-Domänen besitzen und deren GTPase-Aktivität durch GPA1 inhibiert werden kann ohne dass dabei die ABA-Bindung beeinflusst wird (Pandey *et al.* 2009). Die Doppelmutante *gtg1 gtg2* zeigt zwar eine reduzierte ABA-Sensitivität, allerdings sind die ABA-Reaktionen nicht komplett blockiert, was für die Existenz weiterer Rezeptoren bzw. alternativer Signalübertragungswege spricht (Christmann und Grill 2009).

Schließlich wurden von zwei unabhängigen Gruppen die Familie der cytosolisch lokalisierten RCARs (*Regulatory Component of ABA-Receptor*) (Ma *et al.* 2009) bzw. PYR1/PYL-Proteine (*Pyrabactin-resistance 1 / -like*) (Park *et al.* 2009a) in Kombination mit Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2C) als ABA-Rezeptoren vorgestellt. Die doppelte Benennung dieser Proteine als RCARs auf der einen und PYR1/PYLs auf der anderen Seite ergab sich aus den verschiedenen Forschungsansätzen der beiden Gruppen, im Rahmen dieser Arbeit wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Bezeichnung RCAR verwendet.

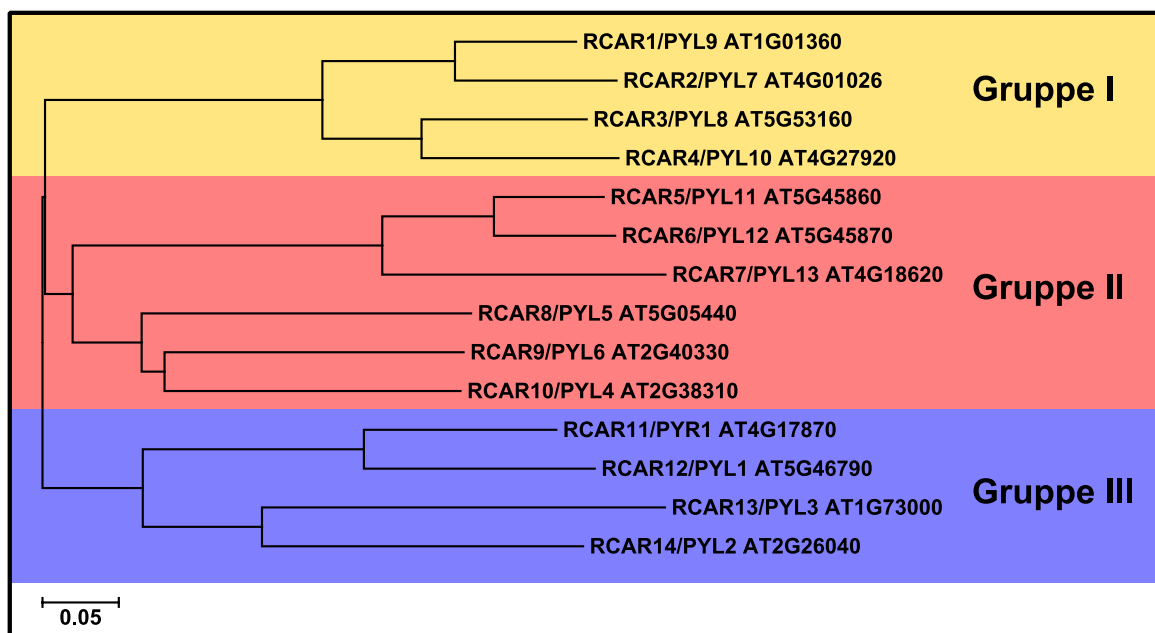


Abb. 1-3 Die RCAR/PYL-Familie in Arabidopsis

Phylogenetischer Baum der RCAR/PYP/PYL-Familie in *Arabidopsis thaliana*, welche 14 Mitglieder in drei Untergruppen umfasst. Erstellt mit MEGA5 (www.megasoftware.net) nach der Minimum-Evolution-Methode.

Einleitung

Die RCAR-Proteine gehören in *Arabidopsis thaliana* einer Familie mit 14 Mitgliedern in drei Untergruppen an. Sie zeigen eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zum Birkenpollenallergen Bet v 1a (75 %) sowie zu START (*Steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer*)-Proteinen auf, welche verschiedene hydrophobe Liganden, darunter Lipide, Antibiotika und Hormone in einer aus 7 β -Faltblättern und 1 bis 3 α -Helices gebildeten Bindungstasche binden können. (Radauer *et al.* 2008; Iyer *et al.* 2001; Gajhede *et al.* 1996) Die RCARs sind in der Lage ABA zu binden und interagieren wie bereits erwähnt, mit PP2Cs der Untergruppe A wie ABI 1 und ABI 2 (*ABA-insensitive 1/2*) (vgl. 1.1.2.2).

Durch die Bildung des Komplexes aus RCAR, PP2C und ABA wird die Phosphataseaktivität der PP2Cs, welche als negative Regulatoren die ABA-Signaltransduktion unterdrücken, inhibiert und dadurch die Signalübertragung freigegeben. Die Dissoziationskonstanten (K_d) für die Bindung von physiologisch aktivem S-ABA an die verschiedenen RCAR-Proteine liegen im Bereich von 1-100 μ M, während die physiologisch relevanten ABA-Konzentrationen im ungestressten Zustand der Pflanze im nanomolaren Bereich liegen und lediglich in extremen Stresssituationen niedrige mikromolare Werte erreichen (Santiago *et al.* 2009b; Ma *et al.* 2009; Miyazono *et al.* 2009; Szostkiewicz *et al.* 2010). Allerdings wurde in *in-vitro*-Phosphataseaktivitätstests mit verschiedenen PP2Cs und RCARs gezeigt, dass halbmaximale Inhibierung der Phosphataseaktivität in einen ABA-Konzentrationsbereich von 10-300 nM erreicht wird, weiterhin wurden für einige RCAR-PP2C-Kombinationen in *Yeast-two-hybrid-screens* auch ABA-unabhängige Interaktionen nachgewiesen. So wurden konstitutive Interaktionen von RCAR1 und RCAR3 mit ABI1 und ABI2 (Ma *et al.* 2009) bzw. von RCAR3, RCAR8 und RCAR9 mit HAB1 (Santiago *et al.* 2009b) gezeigt. Die Bestimmung der Bindungsaffinität von physiologisch aktiver (S)-ABA an RCAR1 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie ergab einen K_d -Wert von 660 nM welche sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von ABI2 auf 64 nM reduzierte, was einer zehnfachen Steigerung der Bindungsaffinität entspricht (Ma *et al.* 2009), ähnliche Ergebnisse wurden für RCAR8 und ABA bzw. RCAR8, HAB1 und ABA mit K_d -Werten von 1,1 μ M und 38 nM erzielt (Santiago *et al.* 2009b). Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass nicht die RCARs alleine als ABA-Rezeptor dienen und dann die nachgeschalteten PP2Cs inaktivieren, sondern dass der RCAR-PP2C-Komplex der eigentliche ABA-Rezeptor ist, wobei die PP2Cs als Corezeptoren fungieren. Wie aus Kristallstrukturanalysen bekannt wurde, bewirkt die Bindung von ABA an RCAR-Proteine eine Konformationsänderung zweier Schlaufen des Proteins, welche die Abscisinsäure in der Bindungstasche umschließen, dabei aber eine Bindestelle für die direkte Interaktion zwischen ABA und Phosphatase frei lassen, welche dann über eine Wasserstoffbrückenbindung durch einen

Einleitung

konservierten Tryptophanrest der Proteinphosphatase koordiniert wird, was im Einklang mit dem Modell der PP2Cs als Corezeptoren steht (Nishimura *et al.* 2009; Shibata *et al.* 2010; Sun *et al.* 2012; Santiago *et al.* 2009a).

1.1.2.2. Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung

Wie bereits erwähnt, spielen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion. In der Übertragung von ABA-Signalen übernehmen Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2Cs) die Rolle zentraler negativer Regulatoren und stehen Proteinkinasen wie CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*) und SnRK2s (*sucrose non-fermenting1 related kinases 2*) gegenüber. In *Arabidopsis* umfasst die Familie der PP2Cs insgesamt 76 Gene, welche nach (Schweighofer *et al.* 2004) phylogenetisch in 10 Gruppen unterteilen lassen.

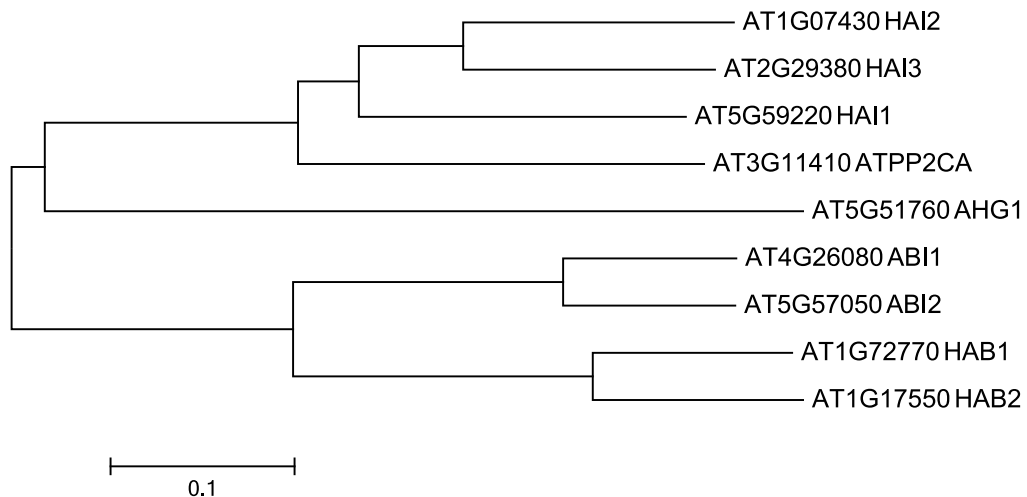


Abb. 1-4 Die Untergruppe A der PP2C-Familie in *Arabidopsis thaliana*

Phylogenetischer Baum der an der ABA-Signalübertragung beteiligten Untergruppe A der in *Arabidopsis thaliana* insgesamt 76 Mitglieder zählenden PP2C-Familie. Erstellt mit MEGA 5 nach der Minimum-Evolution-Methode.

Die katalytische Domäne der *Arabidopsis*-PP2Cs ist hoch konserviert und meist am C-terminus des Proteins lokalisiert (70 aus 76 PP2Cs), während der N-Terminus sowohl in Länge als auch Sequenz eine hohe Variabilität aufweist, ungefähr ein Drittel der PP2Cs weist zusätzlich noch einen C-terminalen Anhang auf. Die Funktion des N-Terminus ist nicht vollständig geklärt, jedoch wird vermutet, dass er für spezifische Protein-Protein-Interaktionen wie beispielsweise zur Substraterkennung oder zur Anlagerung an Komplexe verantwortlich sei. Die ersten PP2Cs, für die eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion gezeigt wurde, ABI1 und ABI2 (Koornneef *et al.* 1984; Gosti *et al.* 1999; Leung 1997), sind beide Mitglieder der Gruppe A (nach der Schweighofer-Einteilung), welche noch 7 weitere Gene umfasst (vgl. Abb. 1-4).

Einleitung

Die Transkription aller neun PP2Cs der Gruppe A wird durch ABA-Gabe oder Stressbedingungen, welche eine Stimulation der ABA-Biosynthese verursachen hochreguliert und für mindestens 7 Mitglieder dieser Gruppe konnte bisher gezeigt werden, dass sie als negative Regulatoren der ABA-Antwort fungieren (Fuchs *et al.* 2012). Es wird vermutet, dass die vermehrte Expression der PP2Cs einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus zur Desensibilisierung der Pflanze gegen hohe ABA-Konzentrationen unter andauerndem Stress darstellt (Szostkiewicz *et al.* 2010). Betrachtet man *Knock-out*-Mutanten für einzelne PP2C-Gene, so zeigen diese keinen oder nur einen schwachen ABA-hypersensitiven Phänotyp, was darauf schließen lässt, dass diese Gene in ihrer Funktion überlappen (Yoshida *et al.* 2006b). Dies wird durch den starken Phänotyp bei gleichzeitiger Inaktivierung mehrerer dieser PP2Cs bestätigt (Saez *et al.* 2006; Rubio *et al.* 2009). Unter den identifizierten Interaktionspartnern der PP2Cs finden sich neben den RCAR-Proteinen (siehe 1.1.2.1) auch Ionenkanäle, Proteinkinasen aus den Gruppen der SnRK2s, CIPKs (*calcineurin B like interacting protein kinases*) und CDPKs sowie Transkriptionsfaktoren, beispielsweise der *Homöodomain*-Transkriptionsfaktor AtHB6 (Himmelbach *et al.* 2002).

Die ABA-induzierten Proteinkinasen aus der SnRK2-Familie spielen eine wichtige Rolle in der ABA-Signaltransduktion, so ist SnRK2.6 (OST1 / *open stomata 1*) ein zentraler Bestandteil des Mechanismus zur Stomataregulation, während SnRK2.2 und SnRK2.3 hauptsächlich an der Regulation der ABA-abhängigen Inhibierung der Keimung und des Keimlingswachstums beteiligt sind (Mustilli *et al.* 2002; Fujita *et al.* 2009). So sind in der *ost1*-Mutante sowohl der ABA-induzierte Stomataschluss als auch die ABA-vermittelte Inhibierung der lichtinduzierten Stomataöffnung nicht funktional, während die licht- und CO₂-vermittelte Regulation der Spaltöffnungen nicht beeinträchtigt sind. *snrk2.2 / 2.3 / 2.6-triple-knock-out-Mutanten* sind in allen ABA-Antworten extrem beeinträchtigt und zeigen eine fehlende Dormanz der Samen (Fujii und Zhu 2009). Die SnRK2s besitzen eine konservierte Kinasedomäne sowie eine C-terminale regulatorische Domäne, welche neben einer SnRK2-*box* noch eine mit sauren Aminosäureresten angereicherte ABA-*box* enthält, die für die Interaktion mit PP2Cs benötigt wird (Yoshida *et al.* 2006a). Die PP2Cs bilden Komplexe mit den SnRK2s, wodurch diese in einem inaktiven Zustand gehalten werden (Vlad *et al.* 2009). Es wurde für OST1 gezeigt, dass die interagierenden PP2Cs ABI1, ABI2 und HAB1 in der Lage sind, die für die Aktivierung der Kinase entscheidende Autophosphorylierungsstelle Ser¹⁷⁵ zu dephosphorylieren (Ng *et al.* 2011). Führt nun ABA zur Inaktivierung der PP2Cs durch die Bildung von RCAR/PP2C/ABA-Komplexen, so sind die SnRKs in der Lage, sich selbst zu aktivieren. Zuerst findet eine partielle Aktivierung der Kinase durch Stabilisierung der Konformation der Kinasedomäne statt, welche durch die SnRK-*box* vermittelt wird, sodass eine

Einleitung

Autophosphorylierung des sog. *Activation-loop* der Kinasedomäne möglich wird, was wiederum zu einer vollständigen Aktivierung der SnRK2s führt und somit zur Phosphorylierung von nachgeschalteten Proteinen (Ng *et al.* 2011). Zu diesen gehören im Fall von OST1 unter anderem die katalytische NADPH-Oxidaseuntereinheit AtrbohF (*respiratory burst oxidase homolog F*) (Sirichandra *et al.* 2009), welche an der Produktion von H₂O₂ in der ABA-Antwort in Schließzellen beteiligt ist (Kwak *et al.* 2003), sowie an der Regulation der Stomata beteiligte Ionenkanäle wie SLAC1 (slow anion-channel associated 1) (Geiger *et al.* 2009) oder der nach innen gerichtete Kaliumkanal KAT1 (Sato *et al.* 2009), wobei die Phosphorylierung von SLAC1 zu dessen Aktivierung führt, KAT1 jedoch durch die Phosphorylierung inaktiviert wird. Neben den SnRKs sind auch CPKs an der ABA-Regulation von Ionenkanälen beteiligt (vgl.1.1.3). Neben der Regulation von Ionenflüssen unterliegt auch die ABA-abhängige Genexpression der Regulation durch Proteinphosphorylierung, so gehören ABA-regulierte Transkriptionsfaktoren aus der b-ZIP-Familie, wie die AREBs/ABFs (*ABA-response element binding factors*) (Furihata *et al.* 2006; Fujita *et al.* 2009; Fujita *et al.* 2012) oder ABI5 (*ABA insensitive 5*) zu den Substraten der SnRK2s, welche durch die Phosphorylierung aktiviert werden, was zur Transkription ABA-regulierter Gene führt. Neben den SnRKs sind auch hier CPKs an der ABA-abhängigen Regulation beteiligt, so werden ABF1 und ABF4 durch CPK4 und CPK11 (Zhu *et al.* 2007) reguliert, für CPK32 wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Regulation der ABFs gezeigt (Choi *et al.* 2005).

1.1.3. Stomataregulation

Da der Gasaustausch zwischen Pflanzen und ihrer Umgebung fast ausschließlich über die Spaltöffnungen stattfindet, stellt deren Regulation, besonders in Stresssituationen, wie beispielsweise Wassermangel, eine der wichtigsten Funktionen des Phytohormons Abscisinsäure dar. Die Spaltöffnungen werden durch zwei benachbarte Schließzellen gebildet, welche in der Lage sind, durch Änderung ihres Turgors ihr Volumen zu beeinflussen und so die Größe der zwischen ihnen gebildeten Pore zu steuern, was durch die Regulation von Ionenflüssen realisiert wird (Joshi-Saha *et al.* 2011). Hierdurch werden sowohl die Aufnahme von CO₂ für die Photosynthese als auch der Wasserverlust durch Transpiration reguliert und im Gleichgewicht gehalten (Schroeder *et al.* 2001b). Unter Normalbedingungen führt Licht zu einer Öffnung der Poren, während Dunkelheit oder erhöhter CO₂-Gehalt der Luft zu einer Reduktion der Porenöffnung führen (Dietrich *et al.* 2001). Das Schließen der Stomata als Reaktion auf ABA ist eine schnelle Reaktion, welche innerhalb weniger Minuten nach der Applikation exogener Abscisinsäure abläuft (Szyroki *et al.* 2001). ABA führt zur Inaktivierung von PP2Cs durch Bildung von RCAR/PP2C/ABA-Komplexen (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009b), was zu einer Aufhebung der Inhibierenden Wirkung der Phosphatasen auf die ABA-Antwort führt und

Einleitung

löst in den Schließzellen eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration durch Aktivierung von calciumdurchlässigen Ionenkanälen in der Plasmamembran aus (Hamilton *et al.* 2000; MacRobbie 2000). Allerdings können neben ABA auch Pathogene (Klüsener *et al.* 2002), Ozon, weitere reaktive Sauerstoffspezies (McAinsh *et al.* 1995; Pei *et al.* 2000; Kwak *et al.* 2003), NO (Desikan *et al.* 2002) oder die Gabe von exogenem Calcium (Allen *et al.* 2001) diese Erhöhung der Calciumkonzentration auslösen. Durch diese initiale Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration wird eine weitere Freisetzung von Calcium, vermittelt durch Botenstoffe wie IP₃, IP₆ oder cADPR sowie durch calciuminduzierte Calciumfreisetzung (CICR, *calcium-induced calcium release*) aus der Vakuole ausgelöst (Peiter *et al.* 2005), was zu spezifischen Oszillationen der cytosolischen Calciumkonzentration führt. Diese Prozesse führen durch Auslösung reversibler Phosphorylierungen zu einer Aktivierung auswärts gerichteter Anionenkanäle an der Plasmamembran (Hedrich *et al.* 1990; Schroeder und Hagiwara 1990), was zum Abfluss von Chloridionen (Cl⁻) aus den Schließzellen führt. Aufgrund der gleichzeitigen Hemmung von Protonenpumpen (H⁺-ATPasen) (Kinoshita *et al.* 1995) sowie nach innen gerichteten Kaliumkanälen (Pilot *et al.* 2001) führt dies zu einer Depolarisierung der Plasmamembran, was wiederum den Abfluss von Kaliumionen (K⁺) in den Apoplasten bei gleichzeitiger Freisetzung von K⁺ aus der Vakuole auslöst (Brault *et al.* 2004; Gobert *et al.* 2007). Der Ionenefflux führt, einhergehend mit der Umwandlung von osmotisch wirksamen Malat in osmotisch unwirksame Stärke, zu einem osmotisch bedingten Abfluss von Wasser aus den Schließzellen, wodurch der Turgor der Zellen sinkt. Dies bewirkt ein Erschlaffen der Zellen, wodurch die Spaltöffnung verschlossen wird.

Es wurde gezeigt, dass die SnRK2 OST1, deren *Knock-out*-Mutanten in der Stomataregulation insensitiv gegen ABA sind (Mustilli *et al.* 2002), durch die PP2Cs ABI1 und ABI2 mittels Dephosphorylierung inaktiv gehalten (Ng *et al.* 2011) wird. Werden diese PP2Cs nun durch ABA inaktiviert, so wird OST1 aktiv und ist in der Lage, den S-Typ-Anionenkanal SLAC1 (*slow anion-channel associated 1*) durch Phosphorylierung zu aktivieren (Geiger *et al.* 2009) sowie die einwärts gerichteten Kaliumkanäle KAT1 und KAT2 durch Phosphorylierung zu inaktivieren (Sato *et al.* 2009), wobei an der Regulation der Aktivität von KAT1 auch CPKs beteiligt sind (Li *et al.* 1998). Weiterhin ist OST1 auch für die Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase durch Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit AtrbohF verantwortlich (Sirichandra *et al.* 2009). Die Aktivierung der NADPH-Oxidase führt zur Produktion von ROS und so zur anhaltenden Inhibierung der PP2Cs sowie zur Freisetzung von Calciumionen, welche durch calciuminduzierte Calciumfreisetzung (CICR, *calcium-induced calcium release*) aus der Vakuole zusätzlich verstärkt und moduliert wird. An diesem Prozess ist auch der durch

Einleitung

Calcium aktivierte SV-(*slow vacuolar*-) Kanal TPC1 (Peiter *et al.* 2005; Schulze *et al.* 2011) beteiligt. Es wurde allerdings in *Solanum tuberosum* auch eine Regulation der NADPH-Oxidasen durch CDPKs gezeigt (Kobayashi *et al.* 2007). Durch die im Rahmen des Stomataschlusses erzeugten Calciumsignaturen werden verschiedene calciumabhängige Proteinkinasen aktiviert, darunter CPK21 und CPK23, welche zusammen mit OST1 für die Aktivierung von SLAC1 verantwortlich sind (Geiger *et al.* 2009; Geiger *et al.* 2010). Weiterhin ist CPK21 an der Aktivierung des SLAC1-homologen Anionenkanals SLAH3 beteiligt (Geiger *et al.* 2011). Für die CPKs 3 und 6 konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls an der Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle beteiligt sind, allerdings ist hier nicht bekannt, ob dies über eine direkte Phosphorylierung der Kanäle erfolgt, oder über einen anderen Mechanismus (Mori *et al.* 2006). Die Inhibierung der H⁺-ATPase OST2 erfolgt ebenfalls calciumabhängig durch CIPK11 (Fuglsang *et al.* 2007). Für den, durch die Depolarisation der Plasmamembran hervorgerufenen, Kalium-Efflux *in den* Apoplasten ist der Kaliumkanal GORK verantwortlich (Hosy *et al.* 2003).

Erst kürzlich wurde auch eine plasmamembranständige Proteinkinase aus der Familie der *receptor-like kinases*, GHR1 (*guard cell H₂O₂-resistant*) identifiziert, welche parallel zu OST1 an der Regulation des Stomataschlusses beteiligt ist. In der *ghr1*-Mutante ist die durch ABA bzw. H₂O₂ induzierte Freisetzung von Calcium und somit das Schließen der Spaltöffnungen beeinträchtigt, während die Reaktion der Schließzellen auf exogenes Calcium der des Wildtyps entspricht. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch GHR1 in der Lage ist, mit SLAC1 zu interagieren und diesen durch Phosphorylierung zu aktivieren (Hua *et al.* 2012).

Es gibt allerdings noch einige weitere Faktoren, welche an der Regulation der Ionenflüsse beim Schließen der Spaltöffnungen beteiligt sind. So zeigen die beiden ABA-hypersensitiven Mutanten *abh1-1* und *era1-2* eine verstärkte Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle, was im Fall von *abh1-1* auf einen Defekt in einem mRNA-CAP-Bindeprotein (HUGOUVIEUX *et al.* 2001) und bei *era1-2* auf eine defekte Farnesyltransferase zurückzuführen ist (Cutler *et al.* 1996).

ABA stimuliert außerdem die Aktivität der Sphingosin-Kinase, was zur Bildung von Sphingosin-1-Phosphat führt, welches zusammen mit GPA1, der einzigen α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins in *Arabidopsis*, die Kaliumeinflusskanäle hemmt (Ng *et al.* 2001). Zusätzlich interagiert GPA1 auch noch mit der Phospholipase D α 1 (PLD α 1) und der von dieser gebildeten Phosphatidsäure (PA), was zu einer Inhibierung der Stomataöffnung führt. Die ABA-abhängig gebildete PA ist zusätzlich auch in der Lage, an ABI1 zu binden und so deren Phosphataseaktivität zu inhibieren, was den Stomataschluss fördert (Mishra 2006).

Einleitung

Abschließend ist noch festzustellen, dass neben ABA auch noch andere Phytohormone Einfluss auf die Regulation der Schließzellen nehmen, wodurch eine genaue Fein Anpassung der Spaltöffnungen an die jeweiligen Wachstumsbedingungen möglich ist (zusammengefasst in Acharya und Assmann 2009).

1.2. Calcium

Calciumionen (Ca^{2+}) stellen einen unverzichtbaren sekundären Botenstoff (*second messenger*) zur Weiterleitung verschiedenster Signale in der Intrazellulären Signalübertragung dar. So sind Calciumsignale in Pflanzen beispielsweise an der Reaktion auf verschiedene abiotische und biotische Stressfaktoren, der Regulation der Stomataapertur (vgl. 1.1.3), der Interaktion mit symbiotischen Mikroorganismen (Ehrhardt *et al.* 1996), sowie an der Regulation des Wachstums von Wurzelhaaren und Pollenschläuchen beteiligt. Grundlage für die Übertragung von Signalen durch Ca^{2+} ist die strikte Regulation der Konzentration an freiem Calcium im Cytosol, welche sich entwickelt hat, da Calciumkonzentrationen, wie sie etwa im Meerwasser vorliegen, innerhalb der Zelle durch die Bildung unlöslicher Phosphatsalze extrem toxisch wirken würden (Bush 1995; Sanders 1999). Die Konzentration an freiem Calcium im Cytoplasma liegt im „Ruhezustand“ bei ca. 200 nM (Trewavas und Gilroy 1991) und wird mit Hilfe von Calcium-ATPasen sowie Calcium-Protonen-Antiportern aufrecht erhalten, welche Calciumionen gegen einen Konzentrationsgradienten aus dem Cytosol heraus in den apoplastischen Raum oder in Organellen wie Vakuole, Chloroplasten und endoplasmatisches Retikulum pumpen (Inesi 1985). Dies führt dazu, dass das Verhältnis der Calciumkonzentrationen innerhalb zu außerhalb der Plasmamembran typischerweise um $1 / 10^4$ liegt (Sanders 1999). Führt nun ein Reiz zur Auslösung eines Calciumsignals, so geschieht dies durch die differenzierte Aktivierung verschiedener Calciumtransporter und -Kanäle, womit durch Aufnahme von Calcium aus dem die Zelle Umgebenden Medium oder durch dessen Freisetzung aus verschiedenen Zellkompartimenten räumlich und zeitlich genau definierte, oftmals periodische Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration herbeigeführt werden (Allen *et al.* 2000; Hwang *et al.* 2000). So entstehen in vielen Fällen Oszillationen der cytosolischen Calciumkonzentration, welche sich in Frequenz, Amplitude und Wellenform je nach Stimulus unterscheiden, wobei Rückkopplungsmechanismen mit den jeweiligen Kanälen an der Modulation dieser Oszillationen beteiligt sind (McAinsh *et al.* 1995; Schuster *et al.* 2002; Meyer und Stryer 1988). Diese Calciumsignaturen werden von spezifischen Calciumsensoren erkannt wodurch dann bestimmte Signalkaskaden aktiviert werden. Grundlage für die räumliche Spezifität der Calciumsignale stellt, neben der Freisetzung von Calcium aus verschiedenen Speichern an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle, auch die

Einleitung

außerordentlich langsame Diffusion von Calciumionen im Cytosol dar, welche sich aus der sehr niedrigen Konzentration an freiem Calcium im Vergleich zur Menge an calciumbindenden Proteinen ergibt (Sanders 1999).

Pflanzen verfügen über mehrere Klassen von Proteinen, welche über calciumbindende EF-Hand-Motive verfügen und als Sensoren für Calciumsignaturen und zur spezifischen Weiterleitung der so vermittelten Signale dienen. Hierzu gehören neben dem in allen Eukaryoten hoch konservierten Calmodulin (CaM) auch noch die Familie der CMLs (*calmodulin-like proteins*) (Roberts *et al.* 1985; Roberts und Harmon 1992) sowie die CBLs (*calcineurin B-like proteins*) (Batistic und Kudla 2004; Luan 2009) und CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*), welche bisher lediglich in Pflanzen sowie einigen Protisten gefunden wurden (Roberts und Harmon 1992; Billker *et al.* 2004). Calmodulin und CMLs werden auch als *sensor relays* bezeichnet, da sie lediglich als Bindeglied zwischen dem Signal und einem nachgeschalteten Regulator fungieren. Sie sind in der Lage, in calciumgebundener Form mit anderen Proteinen, wie beispielsweise Proteinkinasen und -Phosphatasen, Iontentransportern oder Transkriptionsfaktoren zu interagieren, welche über Calmodulinbindestellen verfügen und diese so zu aktivieren (zusammengefasst in (Yang und Poovaiah 2003; Perochon *et al.* 2011)). In einigen Pflanzenspezies finden sich auch sogenannte calcium-calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CCaMKs) welche nicht nur über eine Calmodulinbindedomäne verfügen sondern zusätzlich auch selbst in der Lage sind, Calciumionen zu binden (Yang und Poovaiah 2003). Die pflanzenspezifischen CBLs sind, wie die oben beschriebenen CaM/CML-Proteine als *sensor relays* zu sehen. Sie zeigen spezifische Interaktionen mit einer bestimmten Familie von Proteinkinasen, den *CBL-interacting protein kinases* (CIPKs) (Batistic und Kudla 2004), deren Aktivität durch die CBLs reguliert wird. *A. thaliana* verfügt über 10 CBLs und 26 CIPKs, wodurch sich, ähnliche Möglichkeiten zum kombinatorischen Aufbau verschiedener CBL-CIPK-Komplexe mit unterschiedlicher Spezifität ergeben, wie im Fall der ABA-Rezeptoren. Da die CBL/CIPK-Komplexe *in vivo* auch ohne gebundenes Calcium eine hohe Stabilität aufweisen werden sie häufig auch als bimolekulare *sensor-responder* beschrieben, da diese Komplexe sowohl das Signal erkennen als auch durch die Kinaseaktivität der CIPKs weiterleiten (Hashimoto und Kudla 2011). Die Lokalisation der CBL/CIPK-Komplexe wird ausschließlich durch die CBLs bestimmt (Batistič *et al.* 2010), so sind CBL1 und CBL9 ausschließlich und CBL4 und CBL5 überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, während die CBLs 2, 3, 6 und 10 mit der Membran der Vakuole assoziiert sind und die CBLs 7 und 8 frei in Cytoplasma und Zellkern vorliegen. Jedes CBL-Protein interagiert mit einer spezifische Auswahl an CIPKs und umgekehrt, durch die Interaktion mit verschiedenen CBLs ist auch die Realisierung verschiedener Funktionen für eine einzelne CIPK möglich, als Beispiel

hierfür wäre CIPK24 zu nennen, welche im Komplex mit CBL4 an der Plasmamembran den Export von Natrium durch Regulation des H⁺/Na⁺-Antiporters SOS1 vermittelt, während sie im Komplex mit CBL10 an der Vakuolenmembran die Aufnahme von Natriumionen in die Vakuole reguliert. Insgesamt ist das CBL/CIPK-Netzwerk an der Regulation zahlreicher Ionenporter und -Kanäle beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Anpassung der Pflanzen an verschiedene Stresssituationen (Batistic und Kudla 2004; Luan 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Interaktionen einzelner CIPKs mit PP2Cs und RCARs eine direkte Verbindung zur ABA-Signaltransduktion besteht (Guo *et al.* 2002; Ohta *et al.* 2011). Auf die Rolle der CDPKs, welche als *sensor-responder* die Funktionen eines Calciumsensors und einer Proteinkinase in einem Protein vereinen, soll in Abschnitt 1.2.1 genauer eingegangen werden.

1.2.1. Calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs)

CDPKs oder auch CPKs sind Serin / Threonin-Proteinkinasen, die außer in Pflanzen lediglich in einigen Protisten wie beispielsweise *Toxoplasma* oder *Plasmodium* vorkommen (Harmon *et al.* 2000; Billker *et al.* 2004). Sie vereinen die Funktionen eines Calciumsensors und einer Proteinkinase in einem einzigen Protein, sodass ein Calciumsignal direkt in die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine umgesetzt werden kann. Dies wird dadurch ermöglicht, dass eine calmodulinartige Calciumbindedomäne mit vier EF-Hand-Motiven über ein Verbindungsstück, die sogenannte *junction-domain*, mit der Kinasedomäne verknüpft ist (Sanders *et al.* 2002). In *A. thaliana* umfasst die Familie der CPKs insgesamt 34 Proteine, welche eine konservierte Domänenstruktur teilen. Sie verfügen alle über eine sehr variable N-terminale Erweiterung, gefolgt von der hoch konservierten Kinasedomäne, der bereits erwähnten, autoinhibitorischen *junction-domain* und der calmodulinartigen Calciumbindedomäne. Diese weist bei 25 von 34 CPKs in *Arabidopsis* vier calciumbindende EF-Hand-Motive auf, bei den verbleibenden 9 CPKs ist je mindestens eine Calciumbindestelle mutiert und somit potentiell nicht in der Lage, Calciumionen zu koordinieren (Cheng *et al.* 2002; Hrabak *et al.* 2003).

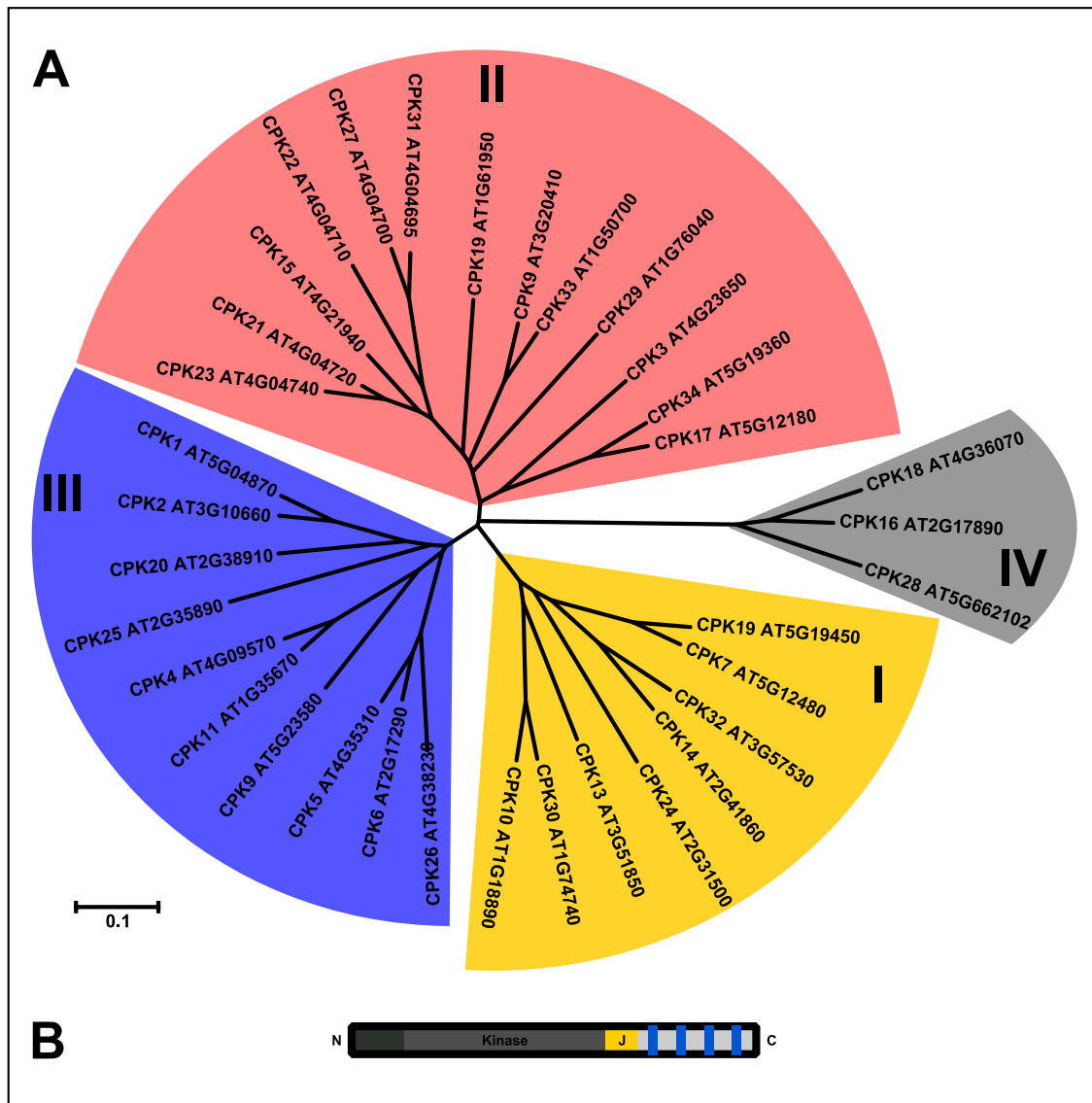


Abb. 1-5 Übersicht der CPK-Genfamilie in Arabidopsis

Die CPK-Genfamilie zählt in *Arabidopsis thaliana* 34 Mitglieder, welche sich in vier Untergruppen unterscheiden lassen. Der Baum wurde mit MEGA 5 nach der Minimum-Evolution-Methode erstellt, die Nummerierung der Untergruppen erfolgte nach (Cheng *et al.* 2002). (A) Alle CDPKs zeigen einen modularen Aufbau mit einem sehr variablen N-Terminus (dunkelgrau), einer konservierten Kinasedomäne (grau) und einer calmodulinartigen Domäne (hellgrau) mit vier EF-Hand-Motiven (blau) welche über die autoinhibitorische Junction-Domäne (gelb) mit der Kinase verbunden ist. (Cheng *et al.* 2002). (B)

Die EF-Hände in CPKs bilden zwei funktionelle Einheiten aus je zwei Bindestellen, den sogenannten *N-lobe* und *C-lobe*, welche sich in der Calciumaffinität unterscheiden. Der *C-lobe* hat eine hohe Calciumaffinität, sodass bereits bei basaler Calciumkonzentration eine Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hände stattfindet, wobei die autoinhibitorische Domäne weiterhin das aktive Zentrum der Kinasedomäne blockiert und die Kinase in einem inaktiven Zustand hält. Die Affinität des *N-lobe* ist geringer, wodurch hier erst bei einer Erhöhung der Calciumkonzentration eine Bindung von Calcium stattfindet, die dann allerdings zu einer Konformationsänderung der regulatorischen Domäne führt, welche

Einleitung

sich auf die distale Seite der Kinasedomäne umfaltet und somit das aktive Zentrum freigibt, wodurch die Kinase aktiviert wird (Vitart *et al.* 2000; Christodoulou *et al.* 2004; Chandran *et al.* 2006). Die hierfür erforderliche Konzentration an freiem Calcium variiert zwischen den verschiedenen CPKs erheblich, da diese sich in den Affinitäten ihrer EF-Hände für Calcium deutlich unterscheiden können (Putnam-Evans *et al.* 1990; Lee *et al.* 1998; Boudsocq *et al.* 2012). 2010 gelang Wernimont *et al.* die Auflösung der ersten vollständigen Kristallstrukturen von CDPKs aus *Toxoplasma gondii* (TgCDPK1 und TgCDPK3) sowie *Cryptosporidium parvum* (CpCDPK1) sowohl in autoinhibierter (*apo*-) Form als auch in der aktiven, calciumgebundenen Form (Wernimont *et al.* 2010). Wernimont *et al.* fassen die autoinhibitorische Domäne und die calmodulinartige Domäne, welche bisher immer getrennt betrachtet wurden, zur *CDPK activation domain* (CAD) zusammen, da diese Abschnitte der CDPKs im Mechanismus der Aktivierung kooperativ zusammenwirken und der autoinhibitorische Teil der CAD lediglich ein Teilabschnitt der CH1-Helix der Calciumbindedomäne ist. Der oben beschriebene Mechanismus zur Aktivierung von CDPKs wurde durch diese Studien bestätigt und die strukturellen Unterschiede zur Calciumbindung an Calmodulin herausgestellt. Weiterhin wurde anhand der Kristallstruktur von calciumgebundener PfCDPK3 (*Plasmodium falciparum* CDPK3) gezeigt, dass eine korrekte Konformationsänderung und somit Aktivierung der Kinase auch gegeben sein kann, wenn eine Calciumbindestelle aufgrund einer Punktmutation nicht in der Lage ist, Ca^{2+} stabil zu koordinieren (Wernimont *et al.* 2011).

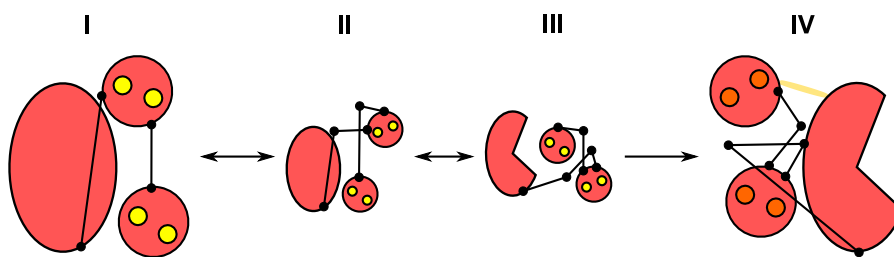


Abb. 1-6 Schematische Darstellung der Aktivierung einer CDPK

Das große oval symbolisiert die Kinasedomäne, die kleineren roten Kreise den N- und C-Lobe mit je zwei EF-Händen (gelb), die schwarzen Linien symbolisieren die Verbindungshelices. Im inaktiven Zustand bei basalen Calciumkonzentrationen blockiert die regulatorische Domäne den Zugang zum aktiven Zentrum der Kinase (I). bei Anstieg der freien Calciumkonzentration erfolgt eine schrittweise Translokation der regulatorischen Domäne (II,III), bis sich diese bei gesättigter Calciumbindung auf der „Rückseite“ der Kinasedomäne befindet und der Zugang zum aktiven Zentrum unbehindert ist (IV). Modifiziert nach (Wernimont *et al.* 2011).

CDPKs werden in allen Pflanzengeweben exprimiert, wobei die Expression bestimmter Isoformen auf bestimmte Zelltypen, Gewebe oder Entwicklungsstadien beschränkt sein kann. Für einige CPKs konnte gezeigt werden, dass die Transkription durch Salz-, Trocken- oder Kältestress aktiviert wird, während die Expression anderer CPKs durch biotischen Stress oder mechanische Verletzung der Pflanze induziert wird. Die

Einleitung

subzelluläre Lokalisation der CPKs unterscheidet sich zwischen den einzelnen Isoformen erheblich. So sind CPKs unter Anderem in Cytosol, Zellkern, Peroxisomen oder an verschiedenen Membranen anzutreffen (Pical *et al.* 1993; Lu und Hrabak 2002; Dammann *et al.* 2003), wobei eine membranassoziierte Lokalisation durch N-terminale Lipidmodifikationen wie Myristoylierung, Palmitoylierung oder S-Acetylierung realisiert wird (Martín und Busconi 2000), integrale Membranproteine sind im Bereich der CPKs bisher nicht bekannt. CPKs sind an einer Vielzahl von Signalübertragungswegen beteiligt, so sind in *Arabidopsis* beispielsweise CPK3, CPK6, CPK21, und CPK23 (Mori *et al.* 2006; Geiger *et al.* 2010) an der ABA-abhängigen Regulation der Schließzellen beteiligt, während CPK4, CPK11 (Zhu *et al.* 2007) und CPK32 (Choi *et al.* 2005) über die Aktivierung von bZIP-Transkriptionsfaktoren aus der Familie der ABFs an der Regulation der Expression ABA-regulierter Gene beteiligt sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass in *Solanum tuberosum* die membranlokalisierte NADPH-Oxidase RbohB durch zwei CDPKs phosphoryliert und somit aktiviert wird, was zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt (Kobayashi *et al.* 2007). Es wurden aber auch Fälle beschrieben, in denen eine CPK-vermittelte Phosphorylierung zur Inaktivierung des Zielproteins führt, wie es für die in der ER-Membran lokalisierte Calciumpumpe ACA2 der Fall ist, welche der negativen Regulation durch CPK1 unterliegt (Hwang *et al.* 2000), während die Aktivierung des selben Proteins durch Interaktionen mit Calmodulinen vermittelt wird (Sze *et al.* 2000) und ACA2 somit eine Schnittstelle zwischen zwei verschiedenen Calciumsignalwegen darstellt, was zugleich ein sehr gutes Beispiel für die Komplexität der Regulationsschleifen und –Mechanismen in der Calciumsignalübertragung darstellt. In Tabak wurde gezeigt, dass eine ethylenvermittelte Verbindung zwischen CPKs und MAPKs besteht (Ludwig *et al.* 2005), sowie dass NtCDPK1 an Übertragung von Gibberellinsignalen beteiligt ist (Ishida *et al.* 2008). So bilden die CPKs und ihre Interaktionspartner ein hochkomplexes Netzwerk in der pflanzlichen Signalübertragung, welches durch seine Diversität in der Lage ist, Schnittstellen zwischen verschiedenen Signalübertragungswegen herzustellen.

1.3. GCA2

Die *gca2-1*-Mutante (*Growth Control by ABA*) wurde bei einem *Screening* auf Pflanzen mit ABA-insensitivem Wurzelwachstum aus einer mittels EMS chemisch mutagenisierten Population von *A. thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* isoliert (Iten 1992). Zusätzlich zum ABA-insensitiven Wurzelwachstum zeigt sie auch eine reduzierte ABA-sensitivität bezüglich Keimung und Spaltöffnungsregulation (Himmelbach *et al.* 1998). Die rezessiv vererbte *gca2-1*-Mutation bewirkt insgesamt einen moderat ausgeprägten ABA-insensitiven Phänotyp und hat weiterhin Auswirkungen auf die embryonale und

Einleitung

vegetative Entwicklung der Pflanze. So ist die Wuchshöhe im Verhältnis zum Wildtyp stark reduziert und einzelne Blätter der Mutante zeigen ein verändertes Seneszenzverhalten sowie einen chlorotischen Phänotyp (Benning 1999).

Für die Schließzellen von *gca2-1* wurde gezeigt, dass die wasserstoffperoxidvermittelte Freisetzung von Calcium ins Cytosol beeinträchtigt ist, wodurch sowohl deren Reaktion auf ABA als auch auf H₂O₂ beeinträchtigt ist (Pei *et al.* 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass die beim Schließen der Stomata durch ABA induzierten Oszillationen der cytosolischen Calciumkonzentration (Allen *et al.* 2000) in *gca2-1* gegenüber dem Wildtyp in ihrer Frequenz verändert sind (Allen *et al.* 2001). Da über die Spaltöffnungen der Gasaustausch der Pflanze mit der Umgebung reguliert wird (vgl. 1.1.3), findet auch eine Regulation der Öffnungen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration statt, erhöhte CO₂-Konzentrationen führen über Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen in der Plasmamembran der Schließzellen zum Schließen der Stomata (Raschke *et al.* 2003). Neben seiner Rolle in der ABA-Signaltransduktion scheint GCA2 auch in diesem Mechanismus involviert zu sein, da in der *gca2-1*-Mutante auch der CO₂-induzierte Stomataschluss beeinträchtigt ist (Young *et al.* 2006), was mit einer fehlenden Modulation der hierbei auftretenden Calciumsignaturen einhergeht. In diesem Punkt unterscheidet sich die *gca2-1*-Mutante erheblich von anderen pleiotrop ABA-insensitiven Mutanten, so zeigt beispielsweise die *abi1-1*-Mutante trotz ABA-Insensitivität eine Reaktion der Stomata auf CO₂ (Young *et al.* 2006), wengleich frühere Studien ein fehlen dieser Reaktion in *abi1-1* postuliert hatten (Webb und Hetherington 1997). Ebenso zeigt die in der Stomataregulation ABA-insensitive *ost1*-Mutante ein normales Ansprechen der Schließzellen auf CO₂ (Mustilli *et al.* 2002). Ein Funktionsverlust der Proteinkinase HT1 führt dagegen zu Unempfindlichkeit gegenüber CO₂ ohne gravierende Auswirkungen auf das Verhalten nach Applikation von ABA (Hashimoto *et al.* 2006).

Die *gca2-1*-Mutation wurde durch positionelle Klonierung als EMS-typischer Austausch eines Cytosins nach Thymin in der 5'-UTR des für die calciumabhängige Proteinkinase CPK23 codierenden Gens identifiziert (Korte 2009). Anhand von GCA2::eGFP-Fusionen wurde gezeigt, dass GCA2 an der Plasmamembran lokalisiert ist, was auf eine Myristoylierung am N-Terminus des Proteins zurückzuführen ist. Es wurde gezeigt, dass in der Mutante leicht erhöhte Mengen des CPK23-Transkripts vorliegen und dass die Mutation über bisher ungeklärte Mechanismen zu einer, nicht direkt mit der Menge an Transkript korrelierenden, signifikanten Erhöhung der in der Zelle vorhandenen Menge des CPK23-Proteins führt. Durch Coexpression von GCA2 und RCAR1 im transienten Protoplastensystem konnte eine zur RCAR1-vermittelten Stimulation der ABA-Antwort antagonistische Wirkung von GCA2 gezeigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde

Einleitung

eine Funktion von CPK23 als negativer Regulator der ABA-Antwort postuliert. Weiterhin wurde die Interaktion des GCA2-Proteins mit dem ABA-Sensor RCAR1 festgestellt (Korte 2009).

Aufgrund dieser Befunde in Kombination mit dem ABA- und CO₂-insensitiven Phänotyp wurde eine Funktion von GCA2 relativ weit am Anfang der ABA-Signalkaskade sowie eine mögliche Rolle bei der Integration verschiedener externer Reize postuliert.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Phytohormon Abscisinsäure ist von essentieller Bedeutung für die Anpassung der Pflanzen an veränderte Umweltbedingungen und Stresssituationen. Obwohl in den vergangenen Jahren viele neue Komponenten des ABA-Signalübertragungsnetzwerks, darunter auch die cytosolischen ABA-Rezeptoren, identifiziert wurden, so ist das Zusammenspiel dieser Komponenten noch in weiten Teilen ungeklärt.

Der pleiotrop ABA-insensitive Phänotyp der *gca2-1*-Mutante wurde auf eine Mutation in der 5'-UTR des *GCA2*-Gens zurückgeführt. Dieses Gen codiert für eine potentielle calciumabhängige Proteinkinase, welcher angesichts der ABA-Unempfindlichkeit der *gca2-1*-Mutante eine wichtige Rolle in der Übertragung von ABA-Signalen zuzukommen scheint. Weiterhin zeigt die *gca2-1*-Mutante ein gegenüber dem Wildtyp reduziertes Wachstum, dessen Ursache bisher nicht bekannt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte als erstes das GCA-Protein rekombinant exprimiert werden um die Proteinkinaseaktivität und deren potentielle Regulation durch Calcium zu verifizieren und mögliche Substrate von GCA2 zu identifizieren. Weiterhin sollte die Phosphorylierung der Proteinkinase selbst sowie der identifizierten Substrate analysiert werden, um Informationen über die Regulation von GCA2 sowie über den regulatorischen Einfluss auf die Substrate auf molekularer Ebene zu erhalten.

Zusätzlich hierzu sollten durch chemische Mutagenese von Samen der *gca2-1*-Mutante Pflanzen isoliert werden, welche trotz der vorhandenen *gca2-1*-Mutation ein normales Sprosswachstum zeigen. Auf diese Weise sollte die Grundlage zur Identifikation weiterer Komponenten, welche die ABA-Signalübertragung mit der Kontrolle des Wachstums verbinden, gelegt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Mikroorganismen und ihre Kultivierung

2.1.1. *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

In dieser Arbeit wurden die im Folgenden gelisteten *E. coli*-Stämme verwendet:

Name	Genotyp	Resistenz	Quelle
DH5 α	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ ,mk ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	---	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ['] proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Tetracyclin	Stratagene (Heidelberg)
M15 pREP4	Derivat von <i>E. coli</i> K12; NaI ^s Str ^s Rif ^s Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ [pREP4 KanR],	Kanamycin	Qiagen (Hilden)

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Flüssigkultur im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten bei 37 °C im Inkubator. Zur Selektion auf enthaltene Plasmide wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (vgl. 2.1.3).

2.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme und ihre Kultivierung

In dieser Arbeit wurde lediglich der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm C58pGV3101 (van LAREBEKE *et al.* 1974) mit dem Ti-Plasmid pMP90 (Koncz und Schell 1986), welches Resistenzmarker gegen Rifampicin und Gentamycin enthält, verwendet. Die Anzucht dieses Stammes erfolgte unter Selektion auf Rifampicin in Flüssigkultur im Schüttler bei 30 °C und 200 rpm in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten bei 30 °C im Inkubator. Zur Selektion auf zusätzlich enthaltene Plasmide wurden dem Medium zusätzlich die entsprechenden Antibiotika beigemischt (vgl. 2.1.3).

2.1.3. Antibiotika

Zur Selektion der oben genannten Bakterienstämme wurden folgende Antibiotika eingesetzt:

Antibiotikum	Arbeitskonzentration (mg/l)	Stammlösung (mg/ml)
Ampicillin	100	200 (H ₂ O)
Chloramphenicol	34	68 (100% Ethanol)
Gentamycin	25	25 (H ₂ O)
Kanamycin	25 - 50	100 (H ₂ O)
Rifampicin	25	25 (DMSO)
Tetracyclin	25	50 (H ₂ O)

Material und Methoden

2.1.4. Herstellung kompetenter Zellen

2.1.4.1. Chemisch kompetente Zellen (*E. coli*)

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme in 250 ml Medium A bei 18 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 kultiviert. Diese Kultur wurde dann 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen durch 15-minütige Zentrifugierung bei 4 °C und 2500 x g pelletiert, in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert, nochmals 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert und nach Einrühren von 0,7 ml DMSO für weitere 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen in Aliquote zu 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

Medium A	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
TB-Medium	10 mM	PIPES pH 6,4
	55 mM	MnCl ₂
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl

2.1.4.2. Elektrokompente Zellen (*E. coli* und *A. tumefaciens*)

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 500 ml LB-Medium bei 30 °C (*A. tumefaciens*) bzw. 37 °C (*E. coli*) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8. Diese Kultur wurde dann 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen durch 10-minütige Zentrifugierung bei 4 °C und 2500 x g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 ml eiskaltem mQ-Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach einmaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die Zellen in 20 ml 10% (v/v) sterilem Glycerol resuspendiert und erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml 10% (v/v) sterilem Glycerol aufgenommen und in Aliquote zu je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.1.5. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

2.1.5.1. Hitzeschock-Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zuerst wurden die bei -80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut, anschließend wurden die Zellen mit 10 µl der DNA-Lösung (Plasmid-DANN in mQ-Wasser oder kompletter

Material und Methoden

Ligationsansatz) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42 °C im Wasserbad, danach wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt, mit 400 µl LB-Medium verdünnt, zur Regeneration 1,5 h bei 37 °C unter Schütteln im Thermomixer inkubiert und auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.1.5.2. Transformation elektrokompenter Bakterien mittels Elektroporation

Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden etwa 200 ng Plasmid-DNA (gelöst in mQ-Wasser) in einem Volumen von 5 µl in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand vorgelegt und mit 40 µl Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Parametern:

E. coli

U = 1800 V
C = 25 µF
R = 200 Ω
T = 5 ms

A. tumefaciens

U = 2500 V
C = 25 µF
R = 700 Ω
T = 17,5 ms

Nach dem Impuls wurden die Zellen in der Küvette mit 800 µl LB-Medium vermischt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1,5 h im Thermomixer bei 30 °C (*A. tumefaciens*) bzw. 37 °C (*E. coli*) unter schütteln inkubiert, bevor sie auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2 d bei 30 °C (*A. tumefaciens*) bzw. über Nacht bei 37 °C (*E. coli*) inkubiert.

2.2. Molekularbiologische Methoden DNA & RNA

2.2.1. Methoden zur DNA-Isolation aus Mikroorganismen

2.2.1.1. DNA-Minipräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden diese mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Hierzu wurden 4 ml einer Übernachtskultur für 4 min bei 4000 x g abzentrifugiert, das Zellpellet in 250 µl GTE-Puffer aufgenommen und mit 250 µl stark alkalischem Lysepuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zur Neutralisation der Lösung und zur Fällung von genomischer DNA sowie Proteinen 250 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8 – 5,2) hinzugefügt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 16000 x g pelletiert und der Überstand anschließend mit dem gleichen Volumen Isopropanol (auf -20 °C vorgekühlt) vermischt und zur Fällung der Plasmid-DNA für 20 min bei -20 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 15000 x g pelletiert, mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut unter denselben Bedingungen für 5 min zentrifugiert und das Pellet nach Entfernung des Überstandes für 10 min bei

Material und Methoden

Raumtemperatur getrocknet und dann in 30-50 µl 0,1 x TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase oder in sterilem mQ-Wasser aufgenommen.

GTE-Puffer	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA (pH 8,0)
	25 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
Lysepuffer	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Neutralisationspuffer	3 M	Kaliumacetat (pH 4,8 bis 5,2)
0,1 x TE-Puffer	1 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	0,1 mM	EDTA

2.2.1.2. DNA-Midipräparation

Zur Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA für Klonierungen, Sequenzierung, Transfektion und Transformation wurden 100 ml Übernachtskultur eingesetzt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des JetStar®-MIDI-Kits (Genomed, Löhne) nach Anleitung des Herstellers. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden Agarosegele eingesetzt.

2.2.2. Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde die CTAB-Methode nach (Murray und Thompson 1980) eingesetzt. CTAB ist ein kationisches Tensid, welches in der Lage ist, Komplexe mit den sehr großen DNA-Molekülen zu bilden und diese so in Lösung zu bringen. Hierzu wurde eine kleine Menge Pflanzenmaterial (max. ca. 300 mg) in flüssigem Stickstoff schockgefroren, unter Verwendung eines Glasstabes in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemörsert, mit 300 µl auf 65 °C vorgewärmtem 2 x CTAB-Puffer versetzt, 30 s mittels Vortexmixer vermischt und für 1 h unter Schütteln bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 300 µl Chloroform zugegeben und homogen mit der wässrigen CTAB-Lösung vermischt. Anschließend wurden die wässrige und organische Phase durch kurze Zentrifugation (5 min bei 16000 x g) getrennt, die leichtere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 300 µl auf Eis vorgekühltem Isopropanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde bei 4 °C mit 16000 x g abzentrifugiert, das Pellet einmal mit 500 µl Ethanol 70 % (v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert und nach entfernen des Überstandes bei 30 °C getrocknet. Das trockene Pellet wurde dann in 50 µl 0,1 x TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase gelöst und erst 30 min bei 37 °C und dann weitere 15 min bei 65 °C inkubiert. Die auf diesem Wege erhaltene DNA wurde zur Genotypisierung von Pflanzen mittels PCR eingesetzt.

Material und Methoden

2 x CTAB-Puffer	2 %	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
	1,4 M	NaCl
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	20 mM	EDTA
0,1 x TE-Puffer	1 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	0,1 mM	EDTA

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für verschiedene Zwecke eingesetzt. Zur Genotypisierung von Pflanzen und zur Überprüfung der Transformation von Bakterien wurde die GoTaq®-Polymerase von Promega (Mannheim) eingesetzt, zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung oder Sequenzierung wurde Pwo-Polymerase (Peqlab, Erlangen) verwendet, da diese über eine Korrekturlesefunktion (*proof reading*) verfügt, wodurch das Risiko von Punktmutationen durch fehlerhaften Einbau von Nukleotiden während der PCR minimiert wird. Die typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes war:

Komponente	Endkonzentration	Volumen [µl] für einen 20 µl-Ansatz
DNA- <i>template</i>	1-10 ng/µl	1
Puffer		
10x komplett f. Pwo (20mM MgSO ₄)	1x	2
5x f. GoTaq	1x	4
dNTP-Mix 2,5 mM je dNTP	200 µM je dNTP	1,6
Primer <i>forward</i> (10 µM)	250 nM	0,5
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	250 nM	0,5
DNA-Polymerase		
Pwo (1U/µl)	0,025 U/µl	0,5
GoTaq (5U/µl)	0,025 U/µl	0,1
mQ-Wasser	Auffüllen auf 20 µl	

Die PCR wurde dann in einem TGradient-PCR-Cycler (Biometra) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zeit [s]	Temperatur [°C]	Vorgang	Zykluszahl
180	95	Initiale Denaturierung	
30	95	Denaturierung	25-35**
30	50-65*	Primer- <i>Annealing</i>	
60 pro kB	72	Elongation	
240	72	Finale Elongation	

* Die Annealingtemperatur ist abhängig von Länge und Sequenz des Primers und lässt sich anhand des prozentualen Anteils der organischen Basen Guanin und Cytosin und seiner Länge in Basenpaaren (PL) näherungsweise die Formel $T_m = 64,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC}\% - 650 / \text{PL}$ berechnen.

Material und Methoden

** Spezifische Variation in Abhängigkeit von verwendeten Primern, Effizienz der Amplifikation und Komplexität des Templates

2.2.4. Kolonie-PCR

Zur schnellen und effizienten Prüfung der Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA ohne spezielle Isolation der DNA aus den Mikroorganismen wurde die Kolonie-PCR eingesetzt. Hierzu wurde etwas Material einer frischen Bakterienkolonie mittels einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einem PCR-Gefäß in 10 µl mQ-Wasser resuspendiert. Anschließend wurde darauf der PCR-Ansatz wie oben beschrieben pipettiert und bei der anschließenden PCR der initiale Denaturierungsschritt bei 95 °C von 3 min auf 10 min verlängert, um eine ausreichende Zerstörung der Zellen zu gewährleisten.

2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten nach Molekülgröße wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Je nach erwarteter Größenverteilung der zu trennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % (w/v) und 2,0 % (w/v) in 1x-TAE-Puffer eingesetzt. Zur Visualisierung der DNA nach der Elektrophorese mittels UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) wurde den Gelen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer suspendiert und bis zur vollständigen Lösung wiederholt aufgeköcht, nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die benötigte Menge an Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel in spezielle Gelträger gegossen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 6x-Ladepuffer (Endkonzentration: 1x) versetzt um die Dichte der Proben zu erhöhen und um über den im Ladepuffer enthaltenen Farbstoff die Migration im Gel verfolgen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V Gleichspannung und Strombegrenzung auf 400 mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente sowie deren Konzentration wurden verschiedene Größenstandards eingesetzt (siehe 0).

50x TAE: 2 M Tris-Base
 5,71 %(v/v) Essigsäure
 50 mM EDTA

1x TAE: Verdünnen von 50x TAE mit mQ-Wasser

2.2.5.1. Verwendete Größenstandards

Zur Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente nach der Elektrophorese sowie zur Abschätzung der aufgetragenen DNA-Menge wurden folgende kommerziell Vertriebene oder selbst hergestellte Größenstandards definierter Konzentration verwendet:

Material und Methoden

λ -Hind III-Marker	Eigene Herstellung*
GeneRuler® 1 kB ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler® 100 bp ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler® 100 bp ladder PLUS	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler® Low-range-DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

*Zur Herstellung des λ -Hind III-Markers wurden 90 μ g λ -DNA in einem Volumen von 1,6 ml für 1 h mit Hind III verdaut, das Enzym für 20 min bei 80 °C inaktiviert und der Ansatz mit 200 μ l Gelladepuffer versetzt. (Endkonzentration: 50 ng/ μ l)

2.2.6. Methoden zur Aufreinigung von DNA

2.2.6.1. Isolation von DNA aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese wurden einzelne DNA-Banden unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mithilfe eines Gelextraktionskits (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben aus der Agarosematrix isoliert.

2.2.6.2. Ethanolfällung von DNA aus Lösungen

Die zu fällende Lösung wurde erst mit dem 0,1-fachen Volumen an 3 M Natriumacetat und anschließend mit dem zweieinhalbfachen Volumen 100 % Ethanol versetzt, gut vermischt und für 60 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die DNA durch 20-minütiges Zentrifugieren (16000 x g / 4 °C) pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.7. Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zum spezifischen Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) sowie von New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) verwendet. Der Verdau wurde nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. So wurde zur Überprüfung von Plasmiden 1 μ g Plasmid-DNA eingesetzt, zum Verdau von PCR-Produkten wurde die komplette Menge des Amplifikats, welche nach der Isolation aus dem PCR-Ansatz zur Verfügung stand, eingesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt, je nach Herstellerangabe, neben dem entsprechenden Reaktionspuffer 1-2 U Restriktionsenzym je Mikrogramm DNA. Die Inkubation erfolgte nach Herstellerangabe, anschließend wurden die erhaltenen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.8. Modifikation von DNA-Enden

2.2.8.1. 5'-Dephosphorylierung

Um bei Klonierungen eine Einschränkung der Ligationseffizienz durch Religation des linearisierten Plasmids zu vermeiden, wurde die linearisierte Plasmid-DNA am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierzu wurden ca. 1-2 µg linearisiertes Plasmid mit 1-2 U alkalischer Phosphatase (NEB, Frankfurt/Main) in einem Volumen von 15 µl des entsprechenden Reaktionspuffers für maximal 30 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

2.2.8.2. Auffüllen von DNA-Überhängen

Je nach verwendetem Restriktionsenzym kann die geschnittene DNA sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende Einzelstrangüberhänge aufweisen. In manchen Fällen ist erforderlich, diese Überhänge zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (MBI-Fermentas) verwendet, welches aufgrund seiner 5'-3'-Polymeraseaktivität in der Lage ist, Überhänge am 5'-Ende aufzufüllen, während es aufgrund seiner 3'-5'-Exonukleaseaktivität überhänge am 3'-Ende entfernt. Hierzu wurde die DNA für 15 min bei 37 °C im vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer mit 10 U Klenow-Fragment pro Mikrogramm DNA inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 20 mM EDTA und Hitzeinaktivierung bei 65 °C (20 min) gestoppt.

2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Zum Einfügen von DNA-Fragmenten in Plasmid wurde die T4-Ligase (MBI-Fermentas) verwendet. Hierzu wurden das linearisierte Plasmid und das gewünschte *Insert* in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 gemischt und in T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer (MBI-Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 0,5 U T4-DNA-Ligase für 15 min bei Raumtemperatur oder 8 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert und 5-10 µl des Ligationsansatzes zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt. Bei der Verwendung elektrokompetenter Zellen wurden lediglich 2 µl des Reaktionsansatzes pro Transformation verwendet.

2.2.10. Zielgerichtete Mutagenese

Die Zielgerichtete Mutagenese oder auch *site-directed mutagenesis* ist eine Methode, die es erlaubt, definierte Punktmutationen in Plasmid-DNA zu erzeugen, welche dann beispielsweise zu einem gewünschten Aminosäureaustausch in einem von dieser DNA codierten Protein führen. Diese Methode kann aber auch zur Korrektur unerwünschter Punktmutationen verwendet werden. Hierzu wurden Primer erstellt, welche den

gewünschten Basenaustausch enthielten und 15 bp vor und nach der Stelle des Austauschs an das zu mutierende Plasmid binden und bei denen der rückwärts gerichtete Primer das genaue invers komplementäre Gegenstück zum vorwärts gerichteten Primer war. So binden die Primer an derselben Stelle im Plasmid je einen der beiden DNA-Stränge und die Amplifikation dieser Stränge läuft dann in entgegengesetzte Richtungen. Für die PCR wurden 50 ng des zu mutierenden, aus *E. coli* isolierten Plasmids als *Template* eingesetzt und mit Hilfe der Ultra Pfu II Hot Start[®]-Polymerase (Agilent) amplifiziert. Nach 20 PCR-Zyklen mit einer Elongationszeit von je 5 min wurde das PCR-Produkt direkt im Reaktionsansatz mit 0,5 U der Restriktionsendonuklease DpnI (NEB) verdaut, welche nur methylierte DNA mit der Erkennungssequenz GA^{CH3}TC schneidet. In den *E. coli*-Stämmen XL1blue und DH5α wird diese Sequenz durch das dam-Methylase-System methyliert, sodass DpnI in der Lage ist, selektiv die aus *E. coli* isolierte *Template*-DNA zu verdauen, nicht jedoch das PCR-Produkt, da dieses nicht methyliert ist. Nach dem Verdau wurde das Enzym für 20 min bei 80 °C inaktiviert und der Reaktionsansatz direkt zur Transformation chemisch kompetenter XL1blue-Zellen eingesetzt. Die beiden in der PCR amplifizierten einzelstränge des Plasmids lagern sich aufgrund ihrer Homologie aneinander und die offenen Enden werden im Rahmen der DNA-Reparatur in den XL1blue-Zellen wieder zu einem funktionalen Plasmid verknüpft. Die eingefügten Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft.

2.2.11. Isolation von RNA aus *Arabidopsis*-Keimlingen

Zur Extraktion von RNA wurden *Arabidopsis*-Keimlinge auf 0,5 x MS-Agarose-Platten angezogen. 100 mg 5 d alter Keimlinge wurden dann zur Extraktion der RNA mit Hilfe des Rneasy[®]-RNA-RNA-Isolationskits (Quiagen, Hilden) eingesetzt, welche nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

2.2.12. Erzeugung von cDNA aus RNA durch reverse Transkription

Zum Umschreiben von mRNA in cDNA wurde ein cDNA-Synthese-Kit (First strand cDNA synthesis kit, MBI-Fermentas) mit der reversen Transkriptase M-MuLV verwendet. Die Reaktion wurde mit 1 µg Gesamt-RNA und einer Mischung aus Oligo-dT-Primern und *Random-Hexamer*-Primern nach Herstellerangabe durchgeführt. 1 µl der so erhaltenen cDNA wurde dann als *Template* zur Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz mittels PCR eingesetzt.

2.2.13. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung Plasmid-DNA aus Transformanden erfolgte über Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder GATC Biotech (Konstanz) unter Beachtung der geforderten DNA-Mengen und Primerkonzentrationen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über

Material und Methoden

entweder mittels VectorNTI-Software (VectorNTI Advance™ 9.1.0, Invitrogen) oder MEGA5 (Freeware, www.megasoftware.net).

2.2.14. Klonierungsstrategien

Im Folgenden sind die Strategien zur Klonierung der im Rahmen dieser Arbeit neu erstellten Plasmide kurz zusammengefasst.

Plasmide zur rekombinanten Proteinexpression:

Für die neu klonierten Konstrukte zur rekombinanten Expression verschiedener Proteinkinasen kam ausschließlich der Expressionsvektor pQE-70 (Strainlist #2098) mit C-terminaler Histidinmarkierung zum Einsatz. Die codierenden Sequenzen der Kinasen wurden mittels PCR aus den unten genannten Quellen amplifiziert und über die genannten Restriktionsschnittstellen in den entsprechend vorbereiteten Vektor eingesetzt.

Konstrukt	Schnittstellen	Primername	Sequenz	Ausgangsmaterial
pQE-70::GCA2	SphI	pQE70GCA2Paef	5'-TTGTAGCATGCTAGG TTGCTTCAGCAGTA-3'	pBI221::35S::GCA2 #2452
	BamHI	pQE70GCA2Bam	5'-TTGTAGGATCCGTGG AATGGATACTGTT-3'	
pQE-70::GCA2-VK	SphI	pQE70GCA2Paef	5'-TTGTAGCATGCTAGG TTGCTTCAGCAGTA-3'	pBI221::35S::GCA2 #2452
	BamHI	pQE70GCA2VKr	5'-TTGTAGGATCCGAATT GCTTCATACGTGATA-3'	
pQE-70::CPK21	SphI	pQE70GCA2Paef	5'-TTGTAGCATGCTAGG TTGCTTCAGCAGTA-3'	p35S::CPK21_HA- Strep #3223
	BamHI	pQE70CPK21Bam	5'-TTGTAGGATCCATGG AATGGAAGCAGTTT-3'	
pQE-70::CPK21-VK	SphI	pQE70GCA2Paef	5'-TTGTAGCATGCTAGG TTGCTTCAGCAGTA-3'	p35S::CPK21_HA- Strep #3223
	BamHI	pQE70VKr	5'-TTGTAGGATCCGAATT GCTTCATACGTGATA-3'	
pQE-70::CPK3	SphI	C3_Sph1_f	5'-TTGTAGCATGCTAGG CCACAGACACACAA-3'	pBI221::p35S::CPK3 #3110
	BamHI	C3_BamH1_r	5'-TTGTAGGATCCCATTG TGCCTCGGTT-3'	
pQE-70::OST1	SphI	2.6_Sph1_f	5'-TTGTAGCATGCTAGAT CGACCAGCAGTGA-3'	p35S::OST1 #3146
	BamHI	2.6_BamH1_r	5'-TTGTAGGATCCCATTG CGTACACAATCTCT-3'	
pQE-70::SnRK2.2	SphI	2.2_Sph1_f	5'-TTGTAGCATGCTAGAT CCGGCGACTAAT-3'	p35S::SnRK2.2 #3217
	BamHI	2.2_Bgl2_r	5'-TTGTAAGATCTGAGA GCATAAACTATCTCTCC A-3'	
pQE-70::SnRK2.3	SphI	2.3_Sph1_f	5'-TTGTAGCATGCTAGAT CGAGCTCCGGTGA-3'	p35S::SnRK2.3 #3222
	BamHI	2.3_BamH1_r	5'-TTGTAGGATCCGAGA GCGTAACTATCTCT-3'	

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine mit 6 x-Histidinmarkierung wurden zuerst über Nacht Vorkulturen der entsprechenden *E. coli*-Stämme aus bis zu 200 Einzelkolonien frisch mit dem entsprechenden Plasmid transformierter Zellen bei 37 °C angezogen. Die Hauptkulturen wurden in einem Volumen von 400 ml LB-Medium mit 10 ml der Vorkulturen angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Bei Erreichen dieser Zelldichte wurde den Kulturen IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zur Induktion der Proteinexpression zugegeben. Die Expression erfolgte anschließend unter folgenden Bedingungen:

CDPKs:	15 h	18 °C
RCARs:	4 h	37 °C
PP2Cs:	2 h	37 °C
SnRKs:	3 h	37 °C

Nach Ende der Expressionsdauer wurden die Kulturen zur Reduktion des bakteriellen Stoffwechsels und der Aktivität von Proteasen möglichst schnell auf 4 °C abgekühlt und die Zellen für 20 min bei 4000 x g pelletiert.

2.3.1. Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die Aufreinigung der 6 x-Histidinmarkierten Proteine aus bakteriellen Zelllysaten erfolgte über Protino[®] Nickel-TED 2000-Säulen (Macherey & Nagel) für Gravitationsgetriebenen Durchfluss nach den Anweisungen des Herstellers. Die Aufreinigung beruht auf dem Prinzip der Immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Die Proteinbindung an der mit Nickel-(II)-Ionen beladenen Silica-Säule basiert auf der Interaktion zwischen den Stickstoffatomen der Seitenketten der Histidinreste der His₆-Markierung und den mit Hilfe des Chelators Triscarboxymethylethylendiamin (TED) immobilisierten Nickel-(II)-Ionen. TED bindet diese über fünf der sechs verfügbaren Koordinationsstellen, wodurch nur noch eine Koordinationsstelle für die Proteinbindung verbleibt. Hierdurch wird eine gegenüber auf Nickel-NTA basierenden Systemen, in denen zwei Koordinationsstellen für die Proteinbindung verfügbar sind, geringere Anfälligkeit für unspezifische Bindungen erreicht.

LEW-Puffer:	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	pH = 8,0 eingestellt mit NaOH		

Material und Methoden

Lysozym-Stammlösung: 10 mg/ml in LEW-Puffer

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol
 pH = 8,0 eingestellt mit NaOH

2.3.1.1. Aufschluss

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in 1 ml LEW-Puffer je Gramm Zellen resuspendiert, zu einer Konzentration von 1 mg/ml mit Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der endgültige Aufschluss der Zellen für 3 x 20 s (5 Zyklen) mit Ultraschall. Das Lysat wurde zur Klärung 30 min bei 30000 x g und 4 °C zentrifugiert.

2.3.1.2. Aufreinigung

Nach Äquilibration der Säulen mit 4 ml LEW-Puffer werden diese mit dem geklärten Lysat beladen. Nach durchlauf des Lysats werden die Säulen zweimal mit je 4 ml LEW-Puffer gewaschen. Nach vollständigem Durchlauf des Waschpuffers erfolgte die Elution in 4 getrennt gesammelten Fraktionen zu 0,8 ml in der ersten Fraktion (Totvolumen der Säule) und je 2 ml in den Fraktionen 2-4 mit Elutionspuffer. Die Reinheit und Menge des so gewonnenen Proteins wurde über SDS-PAGE bestimmt. Zusätzlich wurde die Identität der Proteine durch Nachweis der Histidinmarkierung durch Western-Blot mit anschließender Immunodetektion mittels His-Tag-Antikörper sowie für GCA2 unter Verwendung des anti-GCA2-Antikörpers (vgl. 2.3.6 ff) überprüft.

2.3.1.3. Dialyse

Die Dialyse erfolgte in speziellen Dialysekammern (am Lehrstuhl hergestellt) unter Verwendung von Membranen mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 14 kD (VISKING[®] dialysis tubing 36/32, Durchmesser 27 mm, Serva) unter Rühren der Lösung bei 4°C gegen 4 x 100 Volumen Dialysepuffer. Die Vorbereitung der Membranen erfolgte nach Standardprotokoll. Die verschiedenen Dialysepuffer für die verschiedenen Proteine sind im Folgenden aufgelistet.

CDPKs: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
 2 mM DTT

Material und Methoden

SnRKs:	50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	100	mM	NaCl
	2	mM	DTT
RCARs/PP2Cs:	100	mM	Tris-HCl (pH 7,9)
	100	mM	NaCl
	2	mM	DTT

2.3.2. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Je nach beabsichtigtem Einsatzzweck bzw. Ausgangsmaterial wurden verschiedene Methoden zur Proteinextraktion angewendet.

2.3.2.1. Herstellung von Rohextrakten unter denaturierenden Bedingungen

Für die schnelle Extraktion von Gesamtprotein wurden 50 bis 500 mg Pflanzenmaterial, meist mehrere ca. 7 d alte Keimlinge oder ein einzelnes Blatt, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit Hilfe eines Glaspistills zermahlen und mit einer äquivalenten Menge denaturierendem Extraktionspuffer (EB-D) versetzt und 30 s mittels Vortexmischer homogen resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 15 min im Thermomixer unter Schütteln bei 90 °C inkubiert und nach Abkühlen auf RT 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

<u>EB-D:</u>	50 mM	Tris-HCl pH 6,8
	2 %	SDS
	6 M	Harnstoff
	30 %	Glycerol
	0,5 %	β-Mercaptoethanol
	0,1 %	Bromphenolblau
	1,25 mM	NaOH

2.3.2.2. Native Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial

Zur Herstellung von Proteinrohextrakten unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde das Pflanzenmaterial, wie unter 2.3.2.1 beschrieben, schockgefroren und zermahlen. Danach wurde ein äquivalentes Volumen Extraktionspuffer EB-N zugesetzt und die Proben mittels Glasstab homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch 15-minütige Zentrifugation mit 16000 x g bei 4 °C abgetrennt und der Überstand zur weiteren Analyse eingesetzt. Zur besseren Extraktion Membranassoziiierter Proteine sowie bei der Proteinextraktion aus Protoplasten wurde

Material und Methoden

analog verfahren, es wurde lediglich ein mit Triton-X-100 und NaCl supplementierter Extraktionspuffer (EB-T) verwendet (Methode modifiziert nach: Boudsocq *et al.* 2007)

<u>EB-N:</u>	100 mM	HEPES pH 7,5
	5 mM	EDTA
	5 mM	EGTA
	10 mM	DTT
	1 x	Phosphataseinhibitor-Mix*
	1 x	Proteaseinhibitor-Mix**

<u>EB-N:</u>	100 mM	HEPES pH 7,5
	5 mM	EDTA
	5 mM	EGTA
	10 mM	DTT
	1 % (v/v)	Triton-X-100
	75 mM	NaCl
	1 x	Phosphataseinhibitor-Mix*
	1 x	Proteaseinhibitor-Mix**

*PhosSTOP® (Roche)

**cOmplete ultra® (Roche)

2.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte für rekombinant exprimierte Proteine im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung durch den Vergleich der Banden verschiedener Verdünnungen der Probe mit den Banden von BSA-Standards definierter Konzentration. Die Bestimmung des Proteingehaltes nativer Extrakte aus Pflanzen erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen der Extrakte mit einem 50-fachen Überschuss an Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad; verdünnt auf Arbeitskonzentration) vermischt und nach 10-minütiger Inkubation bei RT die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm im Mikrotiterplattenleser oder mittels Photometer gemessen. Zur Kalibrierung der Messung wurden BSA-Lösungen definierter Konzentration analog zu den Proben vermessen und auf diese Weise eine Kalibrierungsgerade berechnet.

2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.3.4.1. Tris-Glycin-SDS-Page

Zur Auftrennung von Proteinen kamen, je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine, TRIS-Glycin-SDS-Polyacrylamidgele verschiedener Porengrößen in Verbindung mit einem kontinuierlichen Puffersystem zum Einsatz. Um die Polymerisation der Gele zu starten, wurde direkt von Gebrauch die benötigte Menge Gelstammlösung mit den entsprechenden Mengen an APS und TEMED versetzt.

Material und Methoden

Für 2 Minigele

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
Acrylamid-Stammlösung	1:16 / 1:32	1:32	1:37,5
mQ-Wasser	1,4 ml	1,4 ml	2 ml
Trenngelpuffer	2 ml	1 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	380 µl
Acrylamidlösung	2 ml	600 µl	500 µl
Glycerol	0,64 ml	-	-
EDTA	-	-	30 µl
TEMED	2 µl	1 µl	1,5 µl
APS	20 µl	10 µl	30 µl

Die in der Tabelle vorgegebene Reihenfolge ist beim Mischen der Komponenten unbedingt einzuhalten.

Trenngel-/ Spacergel-Puffer: 3 M Tris-HCl (pH 8,9)

0,3 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer: 1 M Tris-HCl (pH 6,8)

Acrylamidlösung (1:37,5): 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid

Acrylamidlösung (1:32): 48% (w/v) Acrylamid
1,5% (w/v) Bisacrylamid

Acrylamidlösung (1:16): 48 % (w/v) Acrylamid
3 % (w/v) Bisacrylamid

EDTA: 0,2 M Tetranatrium-EDTA

TEMED: Unverdünntes Tetramethylethylendiamin (Sigma)

APS: 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

Kathodenpuffer (10x): 1 M Tris-HCl
1 M Tricin
1 % (w/v) SDS

Anodenpuffer (10x): 2 M Tris-HCl (pH 8,9)

Die Elektrodenpuffer werden erst unmittelbar vor Gebrauch 1:10 mit mQ-Wasser verdünnt.

Material und Methoden

<u>5x Laemmli-Probenpuffer:</u>	0,3 M	Tris/HCl (pH 6,8)
	10 %	SDS (w/v)
	30 %	Glycerol (v/v)
	0,1 %	Bromphenolblau (w/v)
	100 mM	DTT

Größenstandards: Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder

2.3.5. Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.3.5.1. Coomassie-Färbung

Zur Färbung der Proteinbanden wurden die Acrylamidgele mit Färbelösung bedeckt und 60 s bei 450 W in der Mikrowelle aufgewärmt und anschließend für 10 min auf dem Kippschüttler gefärbt. Dann wurde die Färbelösung abgegossen, die Gele zweimal mit Leitungswasser gewaschen, mit Entfärbelösung bedeckt und erneut in der Mikrowelle erwärmt. Anschließend wurden die Gele auf dem Kippschüttler inkubiert bis sie ausreichend entfärbt waren (30-60 min). Bei der Entfärbung wurde den Gelen noch ein Papiertuch hinzugefügt, um den aus den Gelen herausgelösten Farbstoff aus der Lösung zu binden und so die Entfärbung zu beschleunigen. Bei der Visualisierung von Proteinbanden, welche zur massenspektrometrischen Untersuchung verwendet werden sollten, wurde auf ein Erhitzen in der Mikrowelle verzichtet und die Inkubationszeiten entsprechend auf 60 min bei der Färbung bzw. 12 h bei der Entfärbung verlängert. Gele zur Auftrennung kurzer Peptide wurden vor der Färbung mit Glutaraldehydlösung (5 %) fixiert um eine Diffusion der Peptide zu verhindern.

<u>Färbelösung</u>	0,05 % (w/v)	Coomassie Brilliantblau R-250
	25 % (v/v)	2-Propanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure

2.3.6. Western-Blot

Der Transfer der Proteine aus Acrylamidgelen auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran) erfolgte im semi-dry Blotverfahren. Die Membran und sechs Lagen Filterpapier (Whatman®) wurden zuerst mit Elektrotransferpuffer gesättigt und dann unter Vermeidung von Luftblasen auf der Anode der Transferapparatur aufgeschichtet (3x Filterpapier – Membran – Gel – 3x Filterpapier). Der Transfer erfolgte für 1 h mit 5 mA/cm² unter Begrenzung der Spannung auf max. 25V.

Material und Methoden

Elektrotransferpuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 8,3)
192 mM Glycin
20% Methanol

2.3.7. Immunologischer Nachweis

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei RT unter leichtem Schütteln in der Blockierlösung inkubiert, um die Oberfläche der Membran mit Milchproteinen zu sättigen und so eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers auf der Membran zu verhindern. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper für mindestens 1 h bei RT auf dem Kippschüttler, gefolgt von dreimaligem Waschen (s.o.) mit TBST. Die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT auf dem Kippschüttler, wieder gefolgt von dreimaligem Waschen mit TBST. Die Detektion der Immunokomplexe auf dem Blot erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des Super Signal West Femto Kit (Pierce) nach Herstelleranweisung, wobei eine CCD-Kamera (ORCAII ERG von Hamamatsu, <http://jp.hamamatsu.com>) in Verbindung mit der SimplePCI Software (Version 5.0.0.1503, Compix Inc., Imaging Systems, USA) zum Einsatz kam.

TBS (10x): 1,5 M NaCl
0,2 M Tris/HCl pH 7,5

TBST: 1x TBS supplementiert mit 0,05% (v/v) Tween 20

Blockierungslösung: 3% (w/v) Milchpulver in 1xTBS/T

2.3.8. Antikörper

Die Verdünnung der jeweiligen Antikörper auf die angegebene Arbeitskonzentration erfolgte in TBS.

	Arbeitskonzentration	Quelle
<u>Primärantikörper</u>		
Mouse-anti- α -GFP	1:1.000	Santa-Cruz (USA)
Rabbit-anti- α -GCA2*	1:1.000	Genescript©
*(Korte 2009)		
<u>Sekundärantikörper</u>		
Goat-anti mouse (HRP-Konjugat)	1:10.000	Pierce (USA)
Goat-anti rabbit (HRP-Konjugat)	1:10.000	Pierce (USA)

2.3.9. Fällung proteinhaltiger Lösungen

2.3.9.1. TCA-Fällung

Bei der TCA-Methode wurde die Probe mit dem 5-fachen Volumen an eiskalter 12 % (w/v) TCA-Lösung versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend das gefällte Protein durch Zentrifugation (5 min, 16000 x g) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend einmal mit eiskalter TCA-Lösung und zweimal mit -20 °C kaltem 90 % Aceton gewaschen und jeweils erneut zentrifugiert.

2.3.9.2. Acetonfällung

Bei der Acetonfällung wurde die Probe mit dem 5-fachen Volumen auf -20 °C vorgekühltem 90 % (v/v) Aceton versetzt, mittels Vortexer gut durchmischt und mindestens 2 h, wenn möglich aber über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation (10 min, 16000 X g) pelletiert und das Pellet nach einmaligem Waschen mit -20 °C kaltem 90 % Aceton an der Luft getrocknet

2.3.10. Herstellung von dephosphoryliertem Casein

Die Herstellung von dephosphoryliertem Casein erfolgte nach (Hathaway *et al.* 1983). 2 g Casein wurden in 20 ml Tris (pH 9,5) gelöst und für 10 min auf 100 °C erhitzt, wobei der pH-Wert bei Bedarf durch Zugabe von 0,1 M NaOH nachgestellt wurde. Nach Abkühlen der Lösung wurde das Casein erst 8 h gegen 1 l Tris-Puffer (50mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA pH = 7,5) dialysiert und dann 6 x 8 h gegen je 4 l Wasser. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

2.3.11. Kinaseaktivitätstest

Für die Analyse der Kinaseaktivität kam radioaktiv markiertes ATP (γ -³²P-ATP) mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/ μ mol (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) zum Einsatz. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität des markierten ATP führte diese Menge beim Einsatz von 0,25 μ Ci Radioaktivität in Kombination mit 100 μ M unmarkiertem ATP lediglich zu einer Erhöhung der ATP-Gesamtkonzentration um 0,0025 μ M und wurde daher in allen Quantitativen Berechnungen vernachlässigt. Soweit nicht anders angegeben, wurden Kinaseaktivitätstests nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	Kinasepuffer	10x	2 μ l
	ATP	1 mM	2 μ l
	γ - ³² P-ATP		0,25 μ Ci *
	Proteinkinase		0,5 - 1 μ g
	Substrat		0,5 - 1 μ g
	mQ-Wasser		ad 20 μ l

Material und Methoden

<u>CDPK-Puffer (1x):</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	10	mM	MgCl ₂
	2	mM	DTT
	1	mM	EGTA
	0-30	µM	freies Ca ²⁺ **

<u>SnRK-Puffer (1x):</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	100	mM	NaCl
	10	mM	MgCl ₂
	2	mM	DTT
	(3	mM	MnCl ₂) ***

* γ -³²P-ATP wurde direkt vor Gebrauch mit dem unmarkierten ATP gemischt.

** Die Menge an CaCl₂ welche einem Puffer zugefügt werden musste, um in Verbindung mit dem enthaltenen EGTA eine bestimmte Konzentration an freien Calciumionen zu erhalten, wurde mit der Software MAXC (maxchelator.stanford.edu) berechnet (Patton *et al.* 2004). Eine solche Pufferung der freien Calciumkonzentration ist erforderlich, da das Risiko einer Kontamination mit Calcium aus Glasgeräten, etc. sehr hoch ist.

*** MnCl₂ verstärkt die Aktivität von SnRK2.6 *in vitro* erheblich, bindet *allerdings* auch mit einer höheren Affinität als Calcium an EGTA (oder andere in Frage kommende Chelatoren) (Loukin und Kung 1995) und kann daher nicht in Verbindung mit einer Pufferung der freien Calciumkonzentration verwendet werden.

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis vorbereitet, aber noch kein ATP zugegeben. Die Reaktionen wurden dann durch Zugabe der Mischung aus radioaktiv Markiertem und unmarkiertem ATP gestartet und 30 min bei 23 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen, je nach Versuch, entweder mit 5 µl 5 x-Laemmli-Probenpuffer (SDS-PAGE), 100 µl 12% TCA (Fällung und Szintillationsmessung) oder 2 µl 20% Phosphorsäure (Adsorption an Phosphocellulose) gestoppt. Die Analyse der Proben erfolgte dann entweder durch Autoradiographie nach SDS-PAGE (vgl. 2.3.12) oder durch Vermessung der auf das Gesamtprotein übertragenen Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung (vgl. 2.3.13). Wurden Peptide als Substrat eingesetzt, so erfolgte die Analyse über ein für kleine Peptide geeignetes SDS-PAGE-System. Alternativ wurden Aliquots von 5 µl je Reaktion auf Phosphocellulose (Whatman P81) aufgebracht, welche nach Trocknung bei Raumtemperatur nacheinander 3 x mit je 100 ml 0,85 % Phosphorsäure und 2 x mit je 50 ml 100 % Ethanol gewaschen wurde. Nach vollständiger Trocknung wurden die Phosphocellulosebögen entweder durch Autoradiographie analysiert oder entsprechend der aufgetragenen Proben zerteilt und im Szintillationszähler analog zu TCA-gefällten Proteinen vermessen.

2.3.12. Autoradiographie

Nach erfolgter Auftrennung der Reaktionsansätze mittels SDS-PAGE wurden die Gele auf zwei Lagen Chromatographiepapier aufgebracht und für 2 h bei 80 °C unter Vakuum im Geltrockner vollständig getrocknet und in Kunststoffolie verschweißt. Die so vorbereiteten Gele wurden dann in entsprechenden Kassetten plan auf Speicherphosphorplatten (Fuji BAS Imaging System) gelegt. Nach mindestens 12-stündiger Exposition wurden die Gele von den Phosphorplatten entfernt und die Bilder mittels Laserscanner (Fuji BAS-1800 Phosphoimager) ausgelesen. Für eine quantitative Auswertung von Autoradiogrammen wurde zum Gel noch ein Kontrollstreifen hinzugefügt, auf den vorher bekannte Mengen an Radioaktivem ATP aufgebracht wurden. Zur Quantifizierung der Signale in Autoradiogrammen kam das Bildanalyseprogramm TINA (Raytest, Deutschland) zum Einsatz.

2.3.13. Szintillationsmessung

Für die Messung der Menge an übertragener Radioaktivität auf das Gesamtprotein im Reaktionsansatz wurden die Proteine im Reaktionsansatz nach der TCA-Methode (vgl. 2.3.9.1) gefällt um das nicht umgesetzte γ -³²P-ATP abzutrennen und anschließend in 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) aufgenommen. Diese Lösung wurde dann in 5 ml-Szintillationsküvetten überführt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) versetzt und im Szintillationszähler (Packard Bell) mit einer Messzeit von 2 min pro Probe vermessen.

2.3.14. Phosphorylierung rekombinant exprimierter Proteine

Für die Analyse der Phosphorylierungsstellen in Substraten von GCA2 mittels Massenspektrometrie wurden diese mit rekombinant in *E. coli* exprimiertem GCA2 phosphoryliert. Hierzu wurden 10-20 µg der Substrate mit 20 µg GCA2 in Gegenwart von 10 µM freiem Calcium und 1 mM ATP für 1 h bei 23 °C in einem Volumen von 100 µl inkubiert, zur Kontrolle wurde einem Aliquot jeder Phosphorylierungsreaktion zusätzlich noch 1 µCi γ -³²P-ATP zugesetzt. Die Kontrollansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Phosphorylierung der Proteine autoradiographisch visualisiert und mittels Bildanalysesoftware quantifiziert. Der Rest der Reaktionsansätze wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassiefärbung wurden die Banden der zu analysierenden Proteine ausgeschnitten und die Gelstücke bei RT in der Vakuumzentrifuge getrocknet und zur Analyse gegeben. Alternativ wurden die im Reaktionsansatz enthaltenen Proteine mit Aceton gefällt und nach Vakuumtrocknung bei Raumtemperatur zur Analyse gegeben.

2.3.15. Isotherme Titrationskalorimetrie

Für die Messung der Bindung von Calcium an Proteine musste eine möglichst geringe Kontamination der verwendeten Lösungen mit Calciumionen sichergestellt werden. Daher wurden alle verwendeten Gefäße, Pipettenspitzen und weiteren Geräte vor der Benutzung mit 1 M HCl gefolgt von calciumfreiem Wasser gewaschen. Zur Entfernung von Calcium aus Wasser und Puffern wurden diese über eine Chelex[®]-Säule (Bio-Rad) gereinigt. Die Vorbereitung und Regeneration von Chelex erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Um eine möglichst effiziente Entfernung von Calcium aus GCA2-Lösungen zu gewährleisten, wurden diese wie in (Peshenko 2006) beschrieben, mit EDTA versetzt welches anschließend über mehrfaches Aufkonzentrieren und Verdünnen mit calciumfreiem Puffer wieder entfernt wurde. Hierfür wurden Amicon ultra Zentrifugalfilter (Millipore) eingesetzt.

2.3.16. Phosphataseaktivitätstests

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität sämtlicher PP2Cs sowie die Regulation dieser durch RCARs und S(+)-ABA erfolgte unter Verwendung des synthetischen Substrats 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) aus dem durch die Phosphataseaktivität 4-Methylumbelliferon freigesetzt wird, welches eine im Mikrotiterplattenleser messbare Fluoreszenz (Anregung: 360 nm / Emission: 460 nm) zeigt. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Stoffmenge des freigesetzten Fluorophors und somit zur Aktivität der Phosphatase. Die Messung des Reaktionsverlaufs erfolgte über einen Zeitraum von 10 min, wobei die Intensität der Fluoreszenz in RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) gegen die Zeit aufgetragen wurde. Der so erhaltene Wert für den mittleren Anstieg des Signals im Verlauf der Reaktion (RFU/s) stellt somit ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit dar und lässt einen Vergleich der Enzymaktivitäten innerhalb eines Experiments zu. So wurde die Regulation der Phosphataseaktivität durch RCARs und ABA sowie der Einfluss verschiedener Mutationen in der Phosphatase auf diese Regulation analysiert.

Vor der eigentlichen Messung wurde die Phosphatase mit und ohne Interaktionspartner (RCAR) einer 20-minütigen Vorinkubation im Reaktionspuffer ohne Substrat bei 35 °C unterzogen. Nach der Vorinkubation wurden gleiche Teile des Vorinkubationsansatzes und der ebenfalls auf 35 °C vorgewärmten 2 x-Substratlösung in einer schwarzen Mikrotiterplatte, in der bereits die gewünschte Menge an ABA vorgelegt wurde, gemischt und sofort bei 30 °C im Plattenleser gemessen. Das in den Puffern enthaltene MnCl₂ wurde jeden Tag frisch aus der Stammlösung auf 20 mM verdünnt und den Puffern erst unmittelbar vor deren Verwendung frisch zugesetzt, da Mn-(II)-Ionen in geringen Konzentrationen relativ instabil sind.

Material und Methoden

8 x Vorinkubationspuffer:	800	mM	Tris-HCl (pH 7,9)
	800	mM	NaCl
	4	mM	DTT
MnCl ₂ -Stammlösung:	1 M MnCl ₂ in Wasser		
2 x Substrat:	100	mM	Tris-HCl (pH 7,9)
	100	mM	NaCl
	5	mM	4-Methylumbelliferylphosphat
	0,3	mM	MnCl ₂ (erst unmittelbar vor der Messung zugesetzt)
Vorinkubation (100µl)::	12,5	µl	8 x-Puffer
	1,5	µl	20 mM MnCl ₂ (Frisch verdünnt aus 1M)
	500	ng	RCAR *
	500	ng	Phosphatase *
	ad 100	µl	mQ-Wasser

* Soweit nicht anders angegeben

2.4. Physiologische Methoden

2.4.1. Anzucht von *A. thaliana* in Erde

In dieser Arbeit wurden die *A. thaliana* Ökotypen Landsberg *erecta* (Ler) und Columbia (Col), sowie einige in diesen Ökotypen generierten Mutanten (*gca2-1*, *sup6*, *sup10*) verwendet. Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h Licht ($\sim 180 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bei 22°C und 65% Luftfeuchtigkeit im Wechsel mit 8 h Dunkelheit bei 17°C und 75% Luftfeuchtigkeit in einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ T). Unter diesen Bedingungen betrug die Generationszeit 6-8 Wochen.

2.4.2. Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur

Zur Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur wurden die Samen einer chemischen Oberflächensterilisation unterzogen. Hierzu wurden 50 μl Samen mit 1 ml 80% Ethanol mit 0,1% (v/v) Triton-X 100 versetzt und 30 s gevortext und die Flüssigkeit wieder abgenommen. Dann wurde wieder 1 ml dieser Lösung zugegeben und die Samen hiermit 20 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Samen für 2 min mit 3% Natriumhypochlorit behandelt und 5 x mit sterilem mQ-Wasser gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden dann direkt in der Sterilbank auf MS-Agar-Platten ausgebracht, welche unter sterilen Bedingungen mit Parafilm[®] verschlossen wurden. Zum Brechen der Samendormanz wurden die Platten mit den Samen für 48 h bei 4 °C gelagert, bevor sie im Zellkulturraum unter Dauerlicht mit $50 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ bei 23 °C kultiviert wurden.

Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um ein kombiniertes Pflanzenwachstumsmedium, welches 1% Saccharose und 0,1% MES-Puffer sowie Makrosalze entsprechend dem MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) und Mikrosalze entsprechend dem B5-Medium (Gamborg *et al.* 1968) enthält. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden vor dem Autoklavieren des Mediums 10 g/l Agar zugegeben. Die Zugabe von Antibiotika bzw. ABA erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 60°C. Alle Platten wurden vor Benutzung dunkel bei 4°C gelagert.

<u>10 × MS-Makrosalze:</u>	NH ₄ NO ₃	16,5 g/l
	KNO ₃	19 g/l
	CaCl ₂	3,32 g/l
	KH ₂ PO ₄	1,7 g/l
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	3,7 g/l

Material und Methoden

<u>400 × B5-Mikrosalze:</u>	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,01 g/l
	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,01 g/l
	Na ₂ EDTA	14,6 g/l
	H ₃ BO ₃	1,2 g/l
	KI	0,3 g/l
	MnSO ₄ × 4 H ₂ O	4 g/l
	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,1 g/L
	ZnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,8 g/l
	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	11,2 g/l
<u>1x MS-Medium:</u>	10 × MS-Makrosalze	100 ml/l
	400 × B5-Mikrosalze	2,5 ml/l
	Saccharose	10 g/l
	MES	1 g/l
	KOH	bis pH 5,8
<u>ABA-Lösung:</u>	10 mM ABA in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)	

2.4.3. EMS-Mutagenese

Die chemische Mutagenese von *Arabidopsis*-Samen wurde mit Methansulfonsäure-ethylester (EMS) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2 g Samen (ca. 80000 Stück) wurden in 100 ml mQ-Wasser suspendiert und bis zu einer Konzentration von 30 mM mit EMS versetzt und unter langsamem Rühren 14 h inkubiert. Anschließend wurde mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt und der Überstand nach Sedimentation der Samen vorsichtig dekantiert. Es folgten insgesamt sieben Waschschrte zu je 30 min mit je 200 ml Wasser. Darauf folgte ein Waschschrte zu 30 min mit 200 ml 14 mM β-Mercaptoethanol und weitere vier Waschschrte zu je 30 min mit je 200 ml Wasser. Die EMS-Lösung sowie die Waschlösungen wurden alle in einem Gefäß gesammelt, in dem 10 M NaOH vorgelegt war, sodass die Endkonzentration an NaOH im Gesamtvolumen des Abfalls am Ende 1 M betrug, um den EMS in den Lösungen zu zerstören. Die Gesamte Prozedur wurde unter dem Abzug durchgeführt und alle Gefäße wurden immer nur so kurz als möglich geöffnet, um einen Austritt des EMS in die Raumluft zu vermeiden.

2.4.4. Keimungsversuche

Die Analyse des Keimungsverhaltens von Arabidopsis-Samen erfolgte auf MS-Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen. Gleichaltrige Samen der zu analysierenden Linien wurden unter sterilen Bedingungen vereinzelt auf den Platten ausgebracht und unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Auswertung erfolgte, so nicht anders angegeben, nach 5 Tagen im Kulturraum. Dabei wurde der Durchbruch der Keimwurzel durch die Samenschale als erfolgte Keimung gewertet.

2.4.5. Wurzelwachstumsversuche

Zur Analyse des Wurzelwachstums von Arabidopsis-Keimlingen auf ABA-haltigem Medium wurden die Keimlinge wie unter 2.4.2 beschrieben bis zu einem Alter von 7 d auf vertikal aufgestellten Platten kultiviert und dann auf ABA-haltige Platten transferiert. Die Position der Wurzelspitze wurde auf der Platte nach dem Transfer sowie drei Tage später markiert. Anschließend wurden die Wurzeln der Keimlinge vermessen.

2.4.6. Präparation von *Arabidopsis*-Protoplasten

Zur Isolation von Mesophyll-Protoplasten aus Arabidopsis-Blättern kam ein modifiziertes Protokoll (Abel und Theologis 1998; Sheen 2001) zum Einsatz. Es wurden, soweit nicht anders angegeben, ca. 4 Wochen alte, in Erde angezogene Pflanzen der Ökotypen *Landsberg erecta* oder *Columbia* bzw. verschiedener Mutanten verwendet. Zur Protoplastierung wurden ca. 50 unverletzte Blätter abgeschnitten und sofort nach dem Abtrennen in eine Petrischale mit 15 ml Enzymlösung überführt, wobei auf eine vollständige Benetzung der Blätter mit der Lösung geachtet wurde. Nach 4-stündiger Inkubation auf einem Kippschüttler bei sehr langsamer Bewegung wurde die Protoplastensuspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von ca. 150 µM filtriert und 8 ml WIMK hinzugefügt. Die Protoplasten wurden dann durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 60 x g in einer Tischzentrifuge mit Swing-Out-Rotor sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 5 ml WIMK resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 3 ml MM-Lösung resuspendiert. Nach Bestimmung der Protoplastenkonzentration wurde das Volumen der Suspension nochmal angepasst, um eine Protoplastenkonzentration von 1×10^6 pro ml einzustellen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Auszählung der Protoplasten nach Lebendfärbung mit Fluoresceindiacetat unter dem Epifluoreszenzmikroskop unter Zuhilfenahme eines Hemacytometers. Die Protoplasten wurden vor der Transfektion für 30 min bei Dunkelheit und 4 °C inkubiert.

<u>Enzymlösung:</u>	1	% (w/v)	Cellulase „Onazuka“ R-10 (Yakult, Tokyo, Japan)
	0,25	% (w/v)	Macerozym R-10 (Yakult, Tokyo, Japan)
	400	mM	Mannitol

Material und Methoden

8	mM	CaCl ₂
1	% (w/v)	BSA
5	mM	MES-KOH (pH 5,6)

Die Herstellung der Enzymlösung erfolgte nach einem Standardprotokoll (Sambrook). Für 1 l der Lösung wurden zunächst Cellulase und Macerozym in 500 ml 10 mM MES-KOH (pH 5,6) mit 0,5 mM PMSF gelöst. Diese Lösung wurde dann für 2 x 40 min gegen je 5 l 10 mM MES-KOH (pH 5,6) dialysiert. Nach der Dialyse wurden dann CaCl₂, Mannitol und BSA hinzugefügt und die Lösung auf 1 l gebracht. Nach Kontrolle des pH-Wertes erfolgte die Sterilfiltration der Lösung durch 0,22 µm-Membranfilter. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

<u>WIMK:</u>	0,5	M	Mannitol
	5	mM	MES-KOH (pH 5,8)

<u>MM-Lösung:</u>	400	mM	Mannitol
	15	mM	MgCl ₂
	5	mM	MES-KOH (pH 5,8)

Fluoresceindiacetat-Lösung: 1 mg/ml in Aceton

2.4.7. Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten mit Plasmid-DNA

Die Transfektion der Protoplasten mit Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Polyethylenglycol (PEG-4000). Die DNA wurde hierfür in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit rundem Boden in einem Volumen von 15 µl (max. 15 µg) vorgelegt und mit der selben Menge 800 mM Mannitol vermischt. 100 µl der Protoplastensuspension wurden zugegeben und vorsichtig mit der DNA vermischt. Anschließend wurden 130 µl auf 37 °C vorgewärmte PEG-Lösung zupipettiert, vorsichtig gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Dann wurden 750 µl WIMK zugegeben und wieder vorsichtig gemischt, die Protoplasten wurden dann durch Zentrifugation (2 min, 300 x g, Tischzentrifuge) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 900 µl WIMK resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Protoplasten schließlich, je nach Versuch, in 100-500 µl WIMK resuspendiert und evtl. auf mehrere Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zugabe von ABA erfolgte, soweit nicht anders angegeben, 2 h nach der Transfektion, die Messung der Reporteraktivität erfolgte soweit nicht anders angegeben, 12 h nach der ABA-Applikation. Soweit nicht anders angegeben wurden als Reporterkonstrukte 2 µg p35S::β-D-Glucuronidase (GUS) als Transfektionskontrolle sowie 4 µg pRD29b::Luciferase (LUC, aus *Photinus pyralis*) als ABA-induzierbarer Reporter eingesetzt. Zusätzlich wurden bis zu 9 µg zusätzlicher Effektor-Plasmide eingesetzt.

Material und Methoden

PEG-Lösung: 300 mM CaCl₂
40% PEG-4000
0,5% MES-KOH (pH=5,8)

ABA-Lösung: 10 mM ABA in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Aus dieser ABA-Lösung wurden 100-fach konzentrierte Arbeitslösungen durch Verdünnung in WIMK hergestellt, von denen dann jeweils 1 µl pro 100 µl Protoplastensuspension eingesetzt wurde.

2.4.8. Reporteraktivitätsmessung

Zur Messung der Reporteraktivität wurde die Protoplastensuspension mit einem Volumen (soweit nicht anders angegeben 100 µl) CCLR-Puffer versetzt und gevortext. Durch das im CCLR-Puffer enthaltene Triton-X 100 und die mechanische Beanspruchung wurden die Protoplasten lysiert und so die enthaltenen Proteine freigesetzt.

<u>CCLR-Puffer:</u>	25	mM	Tris-Phosphatpuffer (pH 7,8)
	2	mM	DTT
	2	mM	DCTA
	10	% (v/v)	Glycerol
	0,2	% (v/v)	Triton-X 100

β-D-Glucuronidase

Zur Messung der Glucuronidaseaktivität wurden 90 µl Protoplastenextrakt in einer schwarzen Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 50 µl 3 x MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid) zugegeben. Die Platten wurden anschließend für 15 min bei 30 °C im Mikroplattenleser inkubiert und dabei kontinuierlich alle 30 s die Fluoreszenz des durch die Aktivität der Glucuronidase aus dem Methylumbelliferylglycuronid (MUG) freigesetzten 4-Methylumbelliferons gemessen (Anregung 360 nm / Emission 465 nm). Die Zunahme der Fluoreszenz ist direkt proportional zur vorhandenen Glucuronidaseaktivität und wurde in RFU (*relative fluorescence units*) gemessen. Für die Auswertung wurde die mittlere Zunahme der Fluoreszenz pro Zeiteinheit (RFU/min) herangezogen.

3 x MUG: 6 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid in CCLR

Photinus pyralis-Luciferase

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Protoplastenextrakten wurde nach der Methode von (Luehrsen *et al.*) durchgeführt. Bei dieser Methode bleibt die Lichtemission durch die Verwendung von Coenzym A über einen längeren Zeitraum stabil und ist nicht,

Material und Methoden

wie bei Verwendung von Substratlösungen ohne Coenzym A, nur von vergleichsweise kurzer Dauer (0,3 s). Für den Luciferasenachweis wurden 90 µl der Protoplastenextrakte in geeignete Plastikröhrchen (Sarstedt) pipettiert. Im Luminometer wird als erstes die Hintergrundlumineszenz über 10 s gemessen (Bkg.). Dann wird das nach Zugabe von 100 µl Substrat (LAR) emittierte Licht über 20 s gemessen, wobei die Quantifizierung in relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) erfolgte. Die spezifische Luciferaseaktivität (dRLU in RLU/s) wurde nach folgender Formel ermittelt: $dRLU = (RLU - 2 \cdot Bkg) / 20$.

<u>LAR:</u>	20	mM	Tricin-NaOH-Puffer (pH 7,8)
	0,1	%	(v/v) Triton-X 100
	0,5	mM	EDTA
	30	mM	DTT
	0,5	mM	ATP
	2,7	mM	MgSO ₄
	1	mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂
	250	µM	Coenzym A
	500	µM	Luciferin (PJK GmbH, Kleinbittersdorf)

2.5. Geräte und Chemikalien

2.5.1. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Modell</i>	<i>Hersteller</i>
Blotapparatur	Trans-Blot <i>semi dry</i>	Bio-Rad
CCD-Kamera	ORCAII ERG	Hamamatsu Photonics
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Elektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Inkubatoren	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt
Kippschüttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Luminometer	<i>flash'n glow</i>	Berthold
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
	HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader	Perkin Elmer
Mikroskope	Stemi SV11	Zeiss
	HBO 50 Axioskop	Zeiss
	Axiovert 200	Zeiss

Material und Methoden

Mikrowelle	MC-9287UR	LG
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab
	Mini Protean 3 System	Bio-Rad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultraschall	Sonopuls HD2070	Bandelin
UV-Fotosystem	P91D	Mitsubishi
UV-Gerät	Reprostar 3	Camag
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vakuumzentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachofer
	UNIVAPO 150 ECH	Univapo
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5415C	Eppendorf AG
	Typ 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG
	Universal 16	Hettich
	Minifuge GL	Heraeus Christ
Vakuum-Geltrockner	DrygelSR Mod SE1160	Hoefer Scientific Instruments
Szinillationszähler	Tri-Carb 2100TR	Packard
Phosphor-Imager	Fuji BAS-1800 Phosphor-Imageing-System mit Fuji Speicherphosphorplatten	Fuji / Raytest (Vertrieb)
Isotherme Titrationskalorimetrie	MicroCal iTC ₂₀₀	GE Healthcare

2.5.2. Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) oder New England Biolabs (Frankfurt) verwendet. Restriktionsendonukleasen und Enzyme zur DNA-Modifikation wurden von

Material und Methoden

MBI Fermentas (St. Leon-Rot) sowie von New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen, alle verwendeten Oligonukleotide von Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

2.5.3. *In silico*-Analyse

Erstellung von Homologiemodellen anhand bekannter Proteinstrukturen:

<http://swissmodel.expasy.org/>

Vorhersage von der Domänenstruktur von Proteinen:

<http://prosite.expasy.org/>

Proteinstrukturdatenbank / Vorhersagen über Proteinstrukturen:

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

searchlauncher.bcm.tmc.edu

www.predictprotein.org

Darstellung und Bearbeitung von Proteinstrukturen:

<http://www.expasy.org/spdbv/>

Ermittlung von Arabidopsis-DNA-Sequenzen:

www.arabidopsis.org

Vorhersage eines Restriktionsverdaus:

rna.lundberg.gu.se/cutter2

Homologiesuche sowie Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen:

www.ncbi.nlm.nih.gov (BLAST)

www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

Sequenzvergleiche und phylogenetische Analyse:

tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi

multalin.toulouse.inra.fr/multalin

MEGA5 www.megasoftware.net

Übersetzung einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz:

www.expasy.ch/tools/dna.html

Berechnung von Aminosäureanteilen sowie Proteineigenschaften:

www.expasy.org/tools/protparam.html

3. Ergebnisse

3.1. Suppressoren der *gca2-1*-Mutation

3.1.1. EMS-Screen

Die *gca2-1*-Mutante wurde Anfang der 90er Jahre aus einem EMS-Screen auf Abscisinsäure-insensitives Wurzelwachstum isoliert (Iten 1992) und konnte durch genomische Kartierung dem für die calciumabhängige Proteinkinase CPK23 kodierenden Gen zugeordnet werden (Benning 1999; Hoffmann 2001; Korte 2009) (vgl. 1.3). Um weitere Komponenten der GCA2-vermittelten Signalübertragung zu identifizieren, wurden Samen der *gca2-1*-Mutante mittels EMS mutagenisiert und auf Komplementation des Wachstumsphänotyps der *gca2-1*-Mutante gescreent. Da die *gca2-1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Wuchshöhe aufweist, wurden aus der mutagenisierten Population Pflanzen isoliert, die trotz der *gca2-1*-Mutation ein normales Wachstum zeigten.

Es wurden drei unabhängige Mutagenesen mit je ca. 80000 *gca2-1*-Samen durchgeführt, woraus insgesamt ca. 64000 M₁-Pflanzen angezogen wurden. Das eigentliche Screening wurde dann in der M₂-Generation mit ca. 144000 Einzelpflanzen durchgeführt.

Screen	M ₀	M ₁	M ₂
1-1	80000	15000	52000
1-2			22000
2-1	80000	24000	27000
2-2			21000
2-3			22000
3-1	80000	25000	---

In der M₁-Population der ersten Mutagenese zeigten acht von 15000 Pflanzen einen dem Wildtyp entsprechenden Wachstumsphänotyp, in der M₁-Population der zweiten Mutagenese zeigten elf aus 24000 Pflanzen normales Wachstum. Dies entspricht einem Anteil von 0,53 ‰ bzw. 0,46 ‰ für die erste bzw. zweite Mutagenese. In der M₁-Population der dritten Mutagenese zeigten lediglich fünf Pflanzen einen WT-Phänotyp, was einem Anteil von 0,2 ‰ entspricht.

Der Test dieser Pflanzen aus der ersten und zweiten Mutagenese auf das homozygote Vorhandensein der *gca2-1*-Mutation mittels eines spezifischen DeCAP-PCR-Markers, bei welchem die *gca2-1*-Mutation zur Zerstörung einer über die PCR-Primer generierten

Ergebnisse

EcoRI-Restriktionsschnittstelle führt, zeigte jedoch, dass es sich bei diesen Pflanzen um eine Kontamination des Saatgutes mit Wildtypsamen und nicht um dominante Suppressoren, handelte, die Untersuchung der Kandidaten aus der M_1 -Population der dritten Mutagenese steht noch aus.

In der M_2 -Generation der ersten Mutagenese wurden 133 (erstes Screening) bzw. 17 (zweites Screening) potentielle Suppressoren anhand ihres Wachstums identifiziert. Nach dem Test dieser Pflanzen auf das homozygote Vorhandensein der *gca2-1*-Mutation via DeCAP-PCR blieben noch 12 (erstes Screening) bzw. 2 (zweites Screening) Pflanzen übrig, die sowohl die homozygote *gca2-1*-Mutation, als auch eine dem Wildtyp entsprechende Wuchshöhe aufwiesen.

Diese insgesamt 14 Pflanzen wurden als potentielle Suppressoren in der M_3 -Generation weiter untersucht.

3.1.2. Analyse der potentiellen Suppressoren des ersten Screens

3.1.2.1. Wurzelwachstum

Für diesen Versuch wurden Keimlinge der 12 potentiellen Suppressorlinien und *gca2-1*, *abi1* und *La-er* Wildtyp auf MS-Medium angezogen und nach 7d auf 0,5x MS-Agar-Platten mit einer ABA-Konzentration von 30 μ M umgesetzt. Nach 3d Wachstum unter ABA-Einfluss wurde die Längenzunahme der Primärwurzel seit dem Umsetzen ausgemessen. Als Maß für die ABA-Sensitivität wurde der Anteil der Keimlinge herangezogen, deren Wurzeln auf dem ABA-haltigen Medium noch mindestens weitere 10mm gewachsen sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3-1 dargestellt.

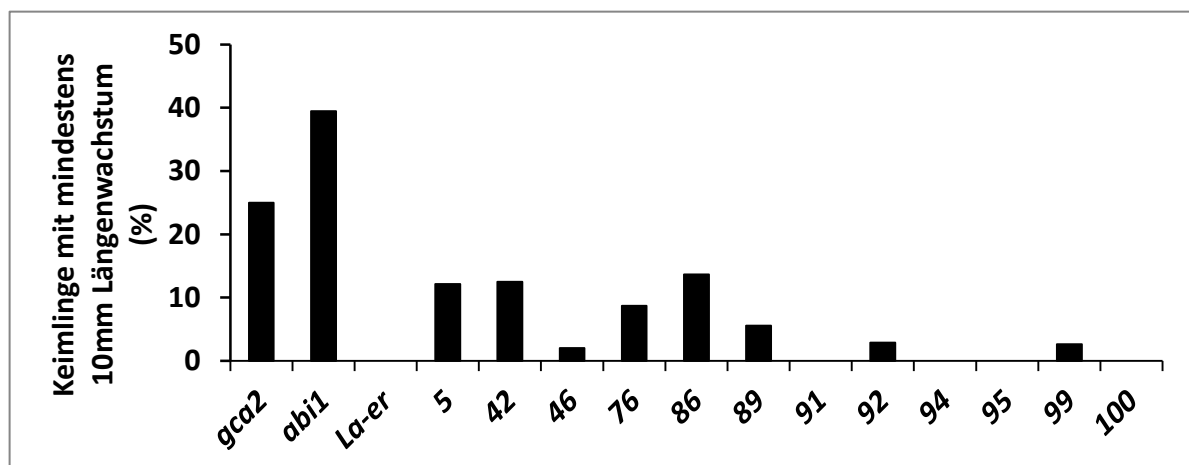


Abb. 3-1 ABA-Sensitivität des Wurzelwachstums der Suppressor-Kandidaten aus dem ersten Screen

Die Keimlinge wurden nach 7d Wachstum auf 0,5x MS-Medium auf ABA-haltiges Medium transferiert. Es wurde der Prozentsatz an Keimlingen gewertet, deren Wurzeln nach dem Transfer auf MS-Medium mit 30 μ M Abscisinsäure innerhalb von 3 d mindestens um 10 mm gewachsen waren. Anzahl der untersuchten Keimlinge je Linie: > 100

Ergebnisse

Die *gca2-1*-Mutante zeigt mit einem Wert von 25% eine höhere Empfindlichkeit gegenüber ABA als die stark insensitive *abi1-1*-Mutante (39%), wogegen im Fall des Landsberg *erecta*-Wildtyps keiner der Keimlinge noch um 10 mm gewachsen war, was für eine normale ABA-Empfindlichkeit steht. Die untersuchten potentiellen Suppressor-Linien zeigten Werte von 2% (Linie #46), 3% (Linien #92 und #99), 6% (#89), 9% (#76) sowie 12% (#5), 13% (#42) sowie 14% (Linie #86), die Linien 91, 94, 95 und 100 zeigten analog dem Wildtypen lediglich Keimlinge mit einem Wurzelwachstum von weniger als 10 mm.

3.1.2.2. Keimung

Die Ergebnisse eines Keimungsversuchs mit einer ABA-Konzentration von 30 μ M sind in Abb. 3-2 dargestellt. *Abi1-1* zeigt mit einer Keimungsrate von 87% eine stark reduzierte ABA-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp mit einer Keimungsrate von 37%. Die *gca2-1*-Mutante zeigt mit 77% eine zu *abi1-1* vergleichbare Keimungsrate. Die Keimungsraten der Suppressor-Kandidaten liegen im Bereich zwischen 23% (Linie #91) bis hin zu 49% im Fall der Linie #89. Somit liegt die ABA-Empfindlichkeit dieser Pflanzen etwas über bzw. unter dem Wert des Wildtyps.

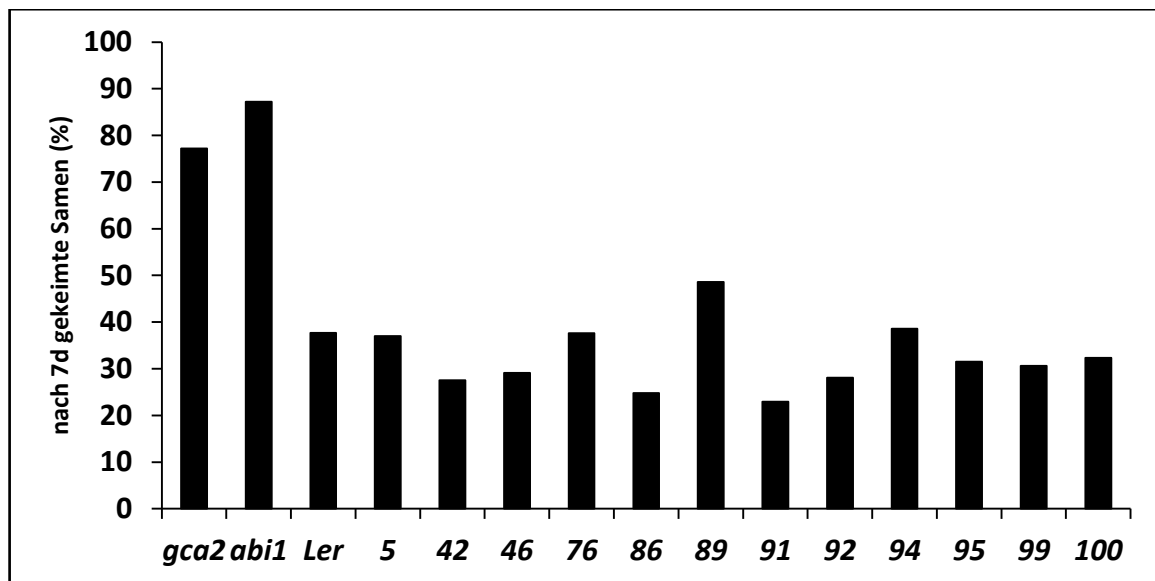


Abb. 3-2 Keimung der potentiellen Suppressorlinien

Es wurde der Anteil der unter Einfluss von 30 μ M ABA nach 7d auf MS-Agar-Platten gekeimten Samen relativ zur Keimung auf abscisinsäurefreiem Medium bestimmt. Anzahl der Samen je Platte: > 100

3.1.2.3. Genotypisierung

Da innerhalb der untersuchten Linien eine unerwartet hohe phänotypische Variabilität zu erkennen war, wurden neben dem Marker für die *gca2-1*-Mutation noch weitere CAP- bzw. SSLP-Marker zur Untersuchung des genetischen Hintergrunds der Suppressorlinien herangezogen. Hierbei zeigte sich, dass es zu einer Kontamination durch Einkreuzung

Ergebnisse

des WT-Allels des *GCA2*-Gens sowie durch Kreuzung mit dem *Arabidopsis*-Ökotyp Columbia gekommen war. Aufgrund des Ausmaßes dieser Kontamination wurde auf eine weitere Untersuchung dieses Material verzichtet und ein neues Screening begonnen.

3.1.3. Charakterisierung der potentiellen Suppressoren des zweiten Screens

Aufgrund der Probleme im ersten Anlauf wurden die 17 neuen Kandidaten vor der weiteren Analyse eingehend auf Kontaminationen untersucht, wodurch 15 der potentiellen Suppressor-Mutanten aussortiert wurden, die verbleibenden zwei Kandidaten zeigten keine feststellbare Kontamination. Auf diese beiden Kandidaten wird im Folgenden als *sup6* und *sup10* Bezug genommen. Die *sup6*-Pflanzen zeigten eine größere Wuchshöhe und einen späteren Blühzeitpunkt im Vergleich zu Wildtyp und *gca2-1*, während die Wuchshöhe von *sup10* zwischen der des Wildtyps und *gca2-1* lag.



Abb. 3-3 *sup6* und *sup10* im Vergleich mit *Landsberg erecta* und *gca2-1*

Das Bild zeigt jeweils 5 Wochen alte Pflanzen. Der Unterschied in der Wuchshöhe zwischen *Ler* und *gca2-1* ist deutlich erkennbar, ebenso die größere Wuchshöhe von *sup6* und *sup10* im Vergleich zu *gca2-1*.

3.1.3.1. Genotypisierung

Die Nachkommen der verbliebenen beiden Kandidaten, *sup6* und *sup10* wurden sicherheitshalber nochmals auf das Vorhandensein der *gca2-1*-Mutation sowie auf Kontaminationen überprüft. In Abb. 3-4 ist repräsentativ das Ergebnis der Überprüfung von sieben Einzelpflanzen der *M₃*-Population von *sup6* sowie von acht Einzelpflanzen aus der entsprechenden *sup10*-Population dargestellt. Die erste Zeile zeigt das Ergebnis für den *GCA2*-DeCAP-Marker, dessen *EcoRI*-Schnittstelle durch die *gca2-1*-Mutation zerstört wird. Alle getesteten Pflanzen außer der WT-Kontrolle und *Columbia* zeigten hier nur eine Bande bei 200 bp, was bedeutet, dass die *gca2-1*-Mutation vorhanden war. Ebenso zeigte sich bei der Überprüfung des *CPK23*-CAP-Markers in allen Fällen außer der *Columbia*-Kontrolle nur das für das *Landsberg erecta*-Allel spezifische Bandenmuster

Ergebnisse

mit zwei Banden bei 220 bp sowie 120 bp, so dass eine Einkreuzung des *CPK23-Columbia*-Allels ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin wurden noch ein CAP-Marker für den Erecta-Locus sowie zwei SSLP-Marker überprüft, welche ebenfalls übereinstimmend nur die für *Landsberg erecta* zu erwartenden PCR-Produkte zeigten.

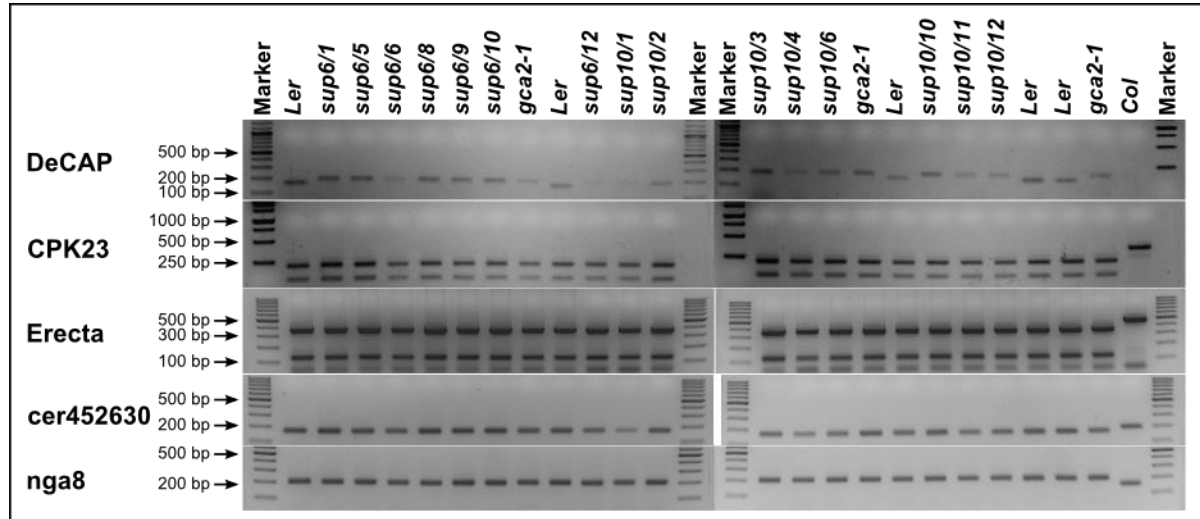


Abb. 3-4 Genotypisierung der Suppressorkandidaten

Repräsentatives Bild der PCR-basierten Genotypisierung der Suppressorkandidaten mittels verschiedener CAP- und SSLP-Marker, sowohl für die *gca2-1*-Mutation als auch zur Unterscheidung des genetischen Hintergrundes zwischen *Ler* und *Col*.

3.1.3.2. Wurzelwachstum und Keimung

Zur Überprüfung der ABA-Sensitivität der Kandidaten wurde, wie bereits unter 3.1.2.1 beschrieben, der Einfluss von ABA auf das Wurzelwachstum von *sup6*- und *sup10*-Keimlingen im Vergleich zu *gca2-1* und WT untersucht. Bei 10 μ M ABA im Medium wurde das Wachstum der Primärwurzel im Wildtyp fast vollständig inhibiert, es zeigte sich lediglich noch ein mittleres Wachstum von $1,5 \pm 0,73$ mm wogegen sich *gca2-1* mit einem Wachstum von $8,0 \pm 2,3$ mm erheblich weniger empfindlich gegenüber ABA zeigte, während *sup6* mit $2,3 \pm 1,3$ mm ein dem WT ähnliches Verhalten aufwies und *sup10* mit $3,8 \pm 1,8$ mm etwas weniger empfindlich reagierte als *Ler* aber immer noch wesentlich empfindlicher als *gca2-1*.

Ergebnisse

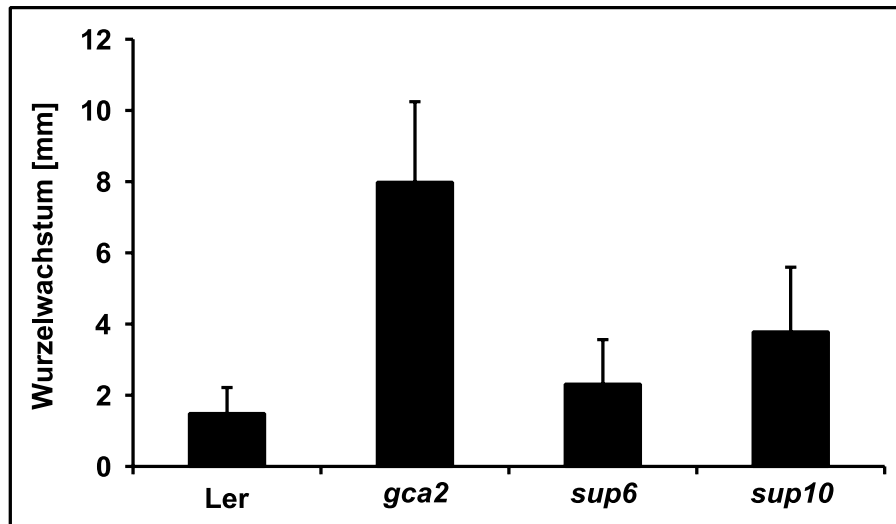


Abb. 3-5 Inhibition des Wurzelwachstums der Suppressorkandidaten durch ABA

Die Keimlinge wurden 7d auf MS-Medium angezogen und anschließend auf MS-Medium mit 10 μM ABA transferiert. Ausgewertet wurde der Betrag des Längenwachstums der Primärwurzel nach 4d auf ABA-haltigem Medium von ~100 Keimlingen pro Linie.

Weiterhin wurde auch das Keimungsverhalten von *sup6* und *sup10* in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen im Medium analysiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl *sup6* als auch *sup10* empfindlicher auf ABA reagierten als der WT. So zeigte *Ler* bis zu einer ABA-Konzentration von 1 μM keine signifikante Reduktion der Keimungsrate gegenüber der Kontrolle ohne ABA, bei 3 μM ABA betrug die Keimungsrate dann allerdings nur noch 40% und bei 30 μM noch 5%.

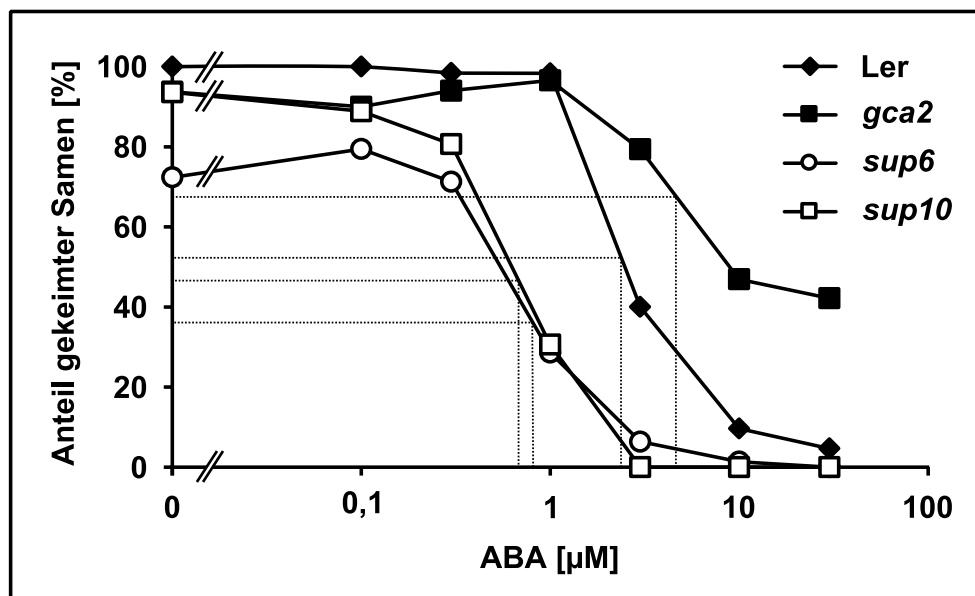


Abb. 3-6 Einfluss von ABA auf die Keimung der Suppressorkandidaten

Anteil der nach 7d auf MS-Medium mit verschiedenen ABA-Konzentrationen gekeimten Samen von *sup6* bzw. *sup10* im Vergleich zu *Ler* und *gca2-1*. Die gepunkteten Linien markieren jeweils den Punkt halbmaximaler Inhibition der Samenkeimung in Relation zu Ausgangs- und Endwert. Anzahl der Samen pro Linie: >100

Ergebnisse

Die *gca2-1*-Mutante zeigte analog zum WT bis 1 μM keinen ABA-Einfluss, allerdings keimten bei 3 μM mit 79% noch doppelt so viele Samen als bei *Ler* und bei 30 μM betrug die Keimungsrate immer noch 42%. *Sup6* zeigte selbst ohne ABA nur eine Keimungsrate von 72%, die höchste Keimungsrate zeigte sich bei 0,1 μM ABA mit 79% um dann über 71% bei 0,3 μM auf 29% und 6% bei 3 μM auf 1% bei 10 μM ABA abzusinken, bei 30 μM zeigte sich keine Keimung mehr. *Sup10* hingegen zeigte ohne ABA eine Keimungsrate von 94%, welche sich über 89% bzw. 81% bei 0,1 μM bzw. 0,3 μM auf 31% bei 1 μM reduzierte und bereits bei 3 μM ABA 0% zu erreichen.

3.2. Funktionelle Charakterisierung von GCA2

GCA2 gehört zur, in *A. thaliana* 34 Mitglieder umfassenden Familie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CDKPs). Bei diesen handelt es sich um Serin/Threonin-Proteinkinasen, die neben einer Kinasedomäne noch über eine calmodulinartige Domäne verfügen. Diese ist durch eine autoinhibitorisch wirkende Verbindungsdomäne (Junction- bzw. J-Domäne) mit der Kinasedomäne verbunden. Im calciumfreien Zustand blockiert die J-Domäne das aktive Zentrum der Kinase, wodurch diese inaktiv ist. Die Bindung von Calciumionen an die EF-Hand-Motive der Calmodulindomäne bewirkt eine Konformationsänderung, durch die das aktive Zentrum freigelegt wird, sodass die Bindung von Substraten möglich wird. Allerdings weisen neun der 34 *Arabidopsis*-CPKs Mutationen in der regulatorischen Domäne auf, welche zum Verlust der Calciumbindefähigkeit mindestens einer der vier EF-Hände führt (vgl. 1.2.1). Aus der Aminosäuresequenz von GCA2 geht hervor, dass die erste EF-Hand an der -Z-Position statt einer Glutamin- oder Asparaginsäure eine Glutaminsäure trägt, wodurch sie nicht in der Lage sein sollte, Calciumionen zu binden (vgl. Abb. 4-1).

Um die Funktion von GCA2 in Vitro zu analysieren, wurde das GCA2-Protein, sowie auch weitere Komponenten des ABA-Signalübertragungsnetzwerks, rekombinant in *E. coli* exprimiert.

3.2.1. Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Um GCA2 in *E. coli* zu exprimieren, wurde die proteinkodierende Sequenz des GCA2-Gens, ausgehend von dem bereits vorhandenen Plasmid pBI221::p35S::GCA2 (Korte, A.) mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE-70 (6x-Histidinmarkierung C-terminal) von Qiagen kloniert. Des Weiteren wurde auch ein Konstrukt zur Expression einer verkürzten Version des GCA2-Proteins erstellt, die lediglich die Aminosäuren 1-348 enthält (GCA2-VK) (Witte *et al.* 2010b) In dieser Version fehlen die regulatorische Junction- und Calmodulindomäne, wodurch man eine konstitutiv aktive, calciumunabhängige Kinase erhält.

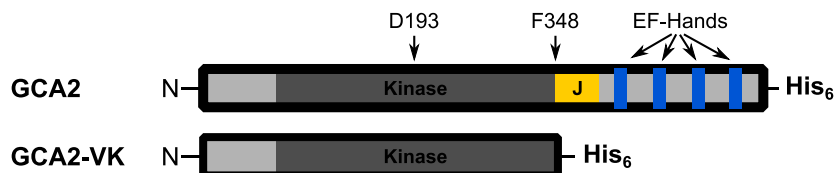


Abb. 3-7 GCA2-Versionen

Zur Charakterisierung der Aktivität von GCA2 wurden verschiedene Versionen des Proteins eingesetzt. Das WT-Protein (GCA2), aufgebaut aus der N-terminalen Domäne (hellgrau), der Kinasedomäne (dunkelgrau) und der regulatorischen Domäne mit Junction (J; gelb)- und calmodulinartiger Domäne (hellgrau/blau) sowie auch eine verkürzte, konstitutiv aktive Version (GCA2-VK), welche nur die Aminosäuren 1-348 beinhaltet, während die regulatorische Domäne entfernt wurde. Ebenso wurden kinaseinaktive Versionen eingesetzt (GCA2-TK/VK-TK), in denen der an der ATP-Bindung beteiligte Asparaginsäurerest D193 durch Alanin ersetzt wurde.

Ergebnisse

Die Expression erfolgt unter Kontrolle des T5-Promotor / *lac*-Operator Transkriptions-Translations-Systems. im Expressionsstamm M15[pREP4], welcher das *lacI*-Gen auf dem pREP4-Plasmid enthält, sodass das *lac*-Repressor-Protein konstitutiv exprimiert wird und durch Bindung an die *lac*-Operator-Sequenzen im pQE-Plasmid die Expression des gewünschten Gens verhindert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG). IPTG bindet an das *lac*-Repressor-Protein und inaktiviert es, wodurch die *E. coli*-RNA-Polymerase in der Lage ist, die auf den T5-Promotor folgende DNA-Sequenz zu transkribieren. Durch die 6x-Histidinmarkierung ist es möglich, in diesem System exprimierte Proteine durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie aus *E. coli*-Lysaten zu isolieren.

Um eine hohe Ausbeute an möglichst reinem Protein zu erhalten, wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet. Hierbei zeigte sich, dass bei 37°C das exprimierte GCA2-Protein bereits ausschließlich in der unlöslichen Fraktion der Zellysate zu finden ist. Die beste Ausbeute an löslichem GCA2 wurde erreicht, indem die Zellen nach der Induktion mit 0,5 mM IPTG für 15h bei 18°C kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen wurden Ausbeuten von bis zu 5mg GCA2-Protein pro Liter Kultur erreicht.

3.2.2. Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die Kinaseaktivität

Um die Funktion des GCA2-Proteins als calciumabhängige Serin/Threonin-Proteinkinase (CDPK) in Vitro zu bestätigen, wurden Kinaseaktivitätstests mit rekombinant exprimiertem GCA2-Protein in Gegenwart verschiedener Mengen an freiem Calcium, verschiedener Substrate und radioaktivem γ -³²P-ATP durchgeführt und anschließend die Menge an Übertragenem radioaktivem Phosphat bestimmt. Als unspezifisches Modellsubstrat kam dephosphoryliertes Casein zum Einsatz, welches nach (Hathaway *et al.* 1983) durch alkalische Dephosphorylierung selbst hergestellt wurde. Neben GCA2 wurde auch CPK21, welche die nächste Verwandte von GCA2 ist getestet. CPK3 diente als zusätzlicher Vergleich. Die Ergebnisse dieses Versuchs für GCA2 sind in Abb. 3-8 dargestellt. Ohne Calcium zeigte GCA2 bereits eine Grundaktivität von 44 ± 17 % des Maximalwertes. Bei Erhöhung der die Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen stieg auch die gemessene Aktivität über $55 \pm 2,5$ % bei 0,3 μM und $75 \pm 1,5$ % bei 3 μM an, um schließlich bei 10 μM freiem Calcium ihr Maximum zu erreichen.

Ergebnisse

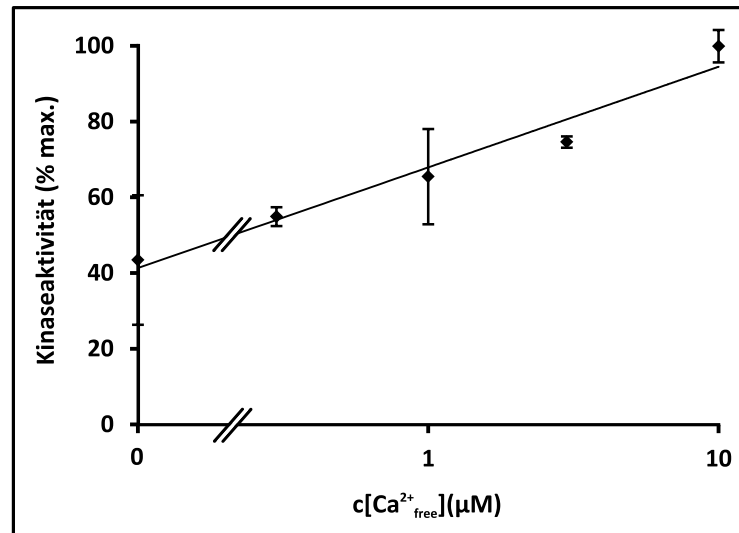


Abb. 3-8 Calciumabhängigkeit der Aktivität von GCA2

300 ng GCA2-Protein wurden jeweils mit 2 µg Casein (dephosphoryliert) in Gegenwart von 0-10 µM freiem Calcium, 50 µM ATP und 0,1 µCi γ -³²P-ATP für 30 min bei 23 °C inkubiert. Die Messwerte repräsentieren die jeweils auf das Gesamtprotein im Ansatz übertragene Radioaktivität im Verhältnis zum Maximalwert (n=3).

Aufgrund der eingangs erwähnten Mutationen in der ersten EF-Hand von GCA2 wurde CPK3, welche über vier funktionale EF-Hände verfügt, als Vergleich herangezogen. Hierbei war deutlich erkennbar, dass die Grundaktivität von CPK3 wesentlich niedriger war als die von GCA2, allerdings stieg die Aktivität von GCA2 langsamer an und erreichte erst bei höheren Calciumkonzentrationen ihr Maximum, als dies für CPK3 der Fall war (Abb. 3-9). So betrug die Aktivität von CPK3 ohne Calcium lediglich $3,9 \pm 0,02$ % stieg dann aber sehr schnell an und erreichte bereits bei 1 µM freiem Ca²⁺ $96,1 \pm 4,9$ % und war bei 3 µM mit $99,6 \pm 4,7$ % gesättigt.

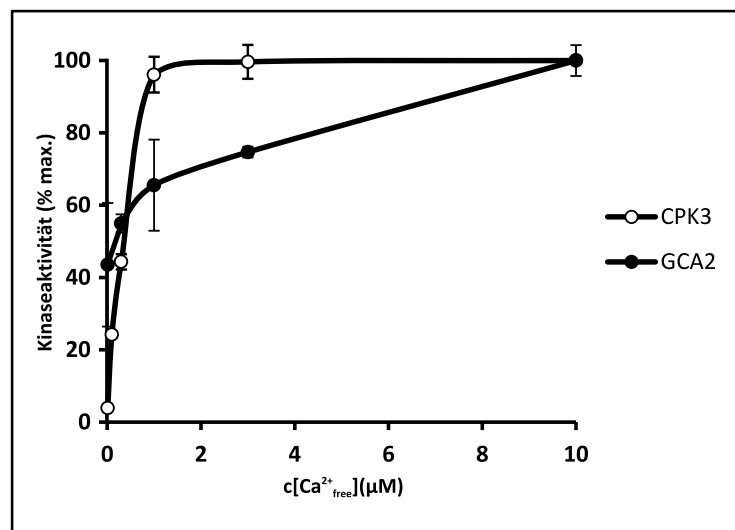


Abb. 3-9 Vergleich der Aktivierung von GCA2 und CPK3

300 ng Proteinkinase wurden jeweils mit 2 µg Casein (dephosphoryliert) in Gegenwart von 0-10 µM freiem Calcium, 50 µM ATP und 0,1 µCi γ -³²P-ATP für 30 min bei 23 °C inkubiert. Die Messwerte repräsentieren die jeweils auf das Gesamtprotein im Ansatz übertragene Radioaktivität im Verhältnis zum Maximalwert (n=3).

Ergebnisse

Für GCA2 ergab sich somit eine Verdopplung der Kinaseaktivität bei Calciumgabe, während die Aktivität von CPK3 durch Calcium auf das 25-Fache der Grundaktivität gesteigert werden konnte. Analog zum Verhalten von CPK3 zeigte auch CPK21 eine 20-fache Steigerung der Kinaseaktivität bei Erhöhung der Calciumkonzentration bis 10 μM (Abb. 3-10), allerdings verlief die Aktivierung von CPK21 langsamer als die Aktivierung von CPK3. So betrug die Aktivität von CPK21 bei 0,3 μM freiem Calcium 13% und bei 1 μM Calcium 64%, während CPK3 bei 1 μM freiem Calcium mit 96% bereits fast vollständig aktiviert war. Somit zeigt CPK21 ein im Vergleich zu GCA2 grundlegend anderes Verhalten in der Aktivierung der Kinaseaktivität als GCA2, obwohl CPK21 mit 81% Identität auf Aminosäureebene der nächste Verwandte von GCA2 in *Arabidopsis thaliana* ist.

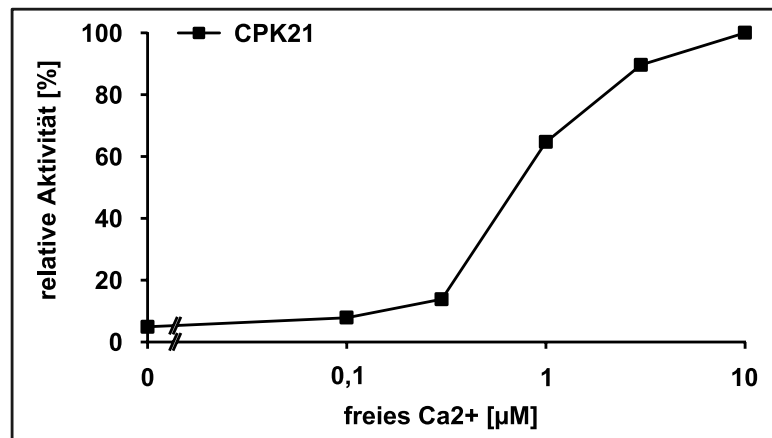


Abb. 3-10 Calciumabhängige Aktivierung von CPK21

Phosphorylierung von Casein durch CPK21 in Gegenwart verschiedener Mengen freien Calciums, die Aktivität wurde durch relative Quantifizierung aus dem Autoradiogramm eines SDS-Gels bestimmt. CPK21 wurde in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, ATP: 100 μM , Casein: 2 μg pro Reaktion.

Im Rahmen dieser Versuche wurde ebenfalls beobachtet, dass die absoluten Aktivitäten der getesteten CPKs untereinander erhebliche Unterschiede aufwiesen. Abb. 3-11 zeigt den Vergleich der absoluten Aktivitäten von GCA2 und CPK21 bzw. GCA2 und CPK3 in Gegenwart von 10 μM freiem Calcium. Bei der parallelen Untersuchung von GCA2 und CPK21 zeigte CPK21 mit 29700 ± 3300 CPM eine im Vergleich zu GCA2 mit 2100 ± 100 CPM 14-fach höhere absolute Aktivität als GCA2. Die Aktivität von CPK3 betrug mit 117300 ± 860 CPM übertragener Radioaktivität sogar das 33-Fache der Aktivität von GCA2 in diesem Experiment (3600 ± 130 CPM)..

Ergebnisse

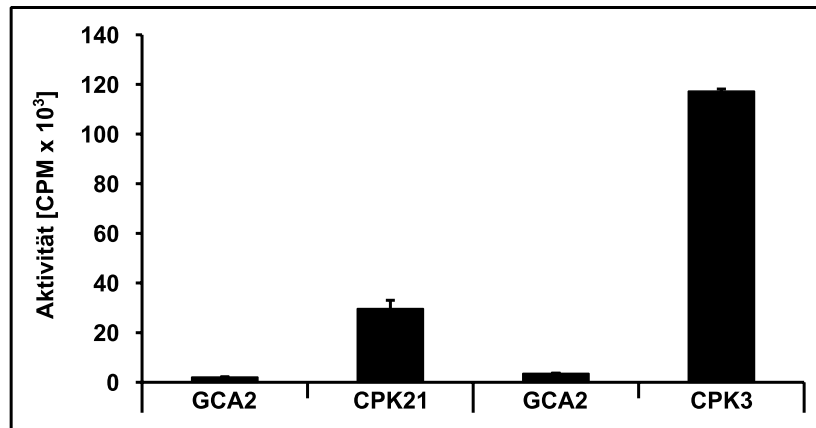


Abb. 3-11 Vergleich der absoluten Aktivität verschiedener CPKs

Vergleich der absoluten Aktivität der verschiedenen getesteten CPKs untereinander in Gegenwart von 10 μM freiem Ca^{2+} . Es wurden jeweils die Absolutwerte der übertragenen Radioaktivität aufgetragen, die Kinasekonzentrationen und Reaktionsbedingungen waren jeweils identisch, der Vergleich erfolgte jeweils innerhalb eines Experiments.

Ergebnisse

3.2.3. Charakterisierung der Calciumbindung mittels ITC

Da gezeigt werden konnte, dass die Menge an verfügbarem Calcium im Reaktionsmedium Einfluss auf die Kinaseaktivität von GCA2 hat, wurde die Bindung von Calcium an GCA2 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Mit Hilfe der ITC ist es möglich, die Interaktion zwischen verschiedenen Bindungspartnern, beispielsweise eines Proteins mit einem anderen Protein oder einem Liganden, thermodynamisch zu charakterisieren. Die Methode beruht auf der quantitativen Erfassung von Temperaturdifferenzen, welche bei der Zugabe des einen Bindungspartners zum anderen aufgrund der bei der Bindung freigesetzten oder aufgenommenen Energie im Reaktionsmedium entstehen (Pierce 1999).

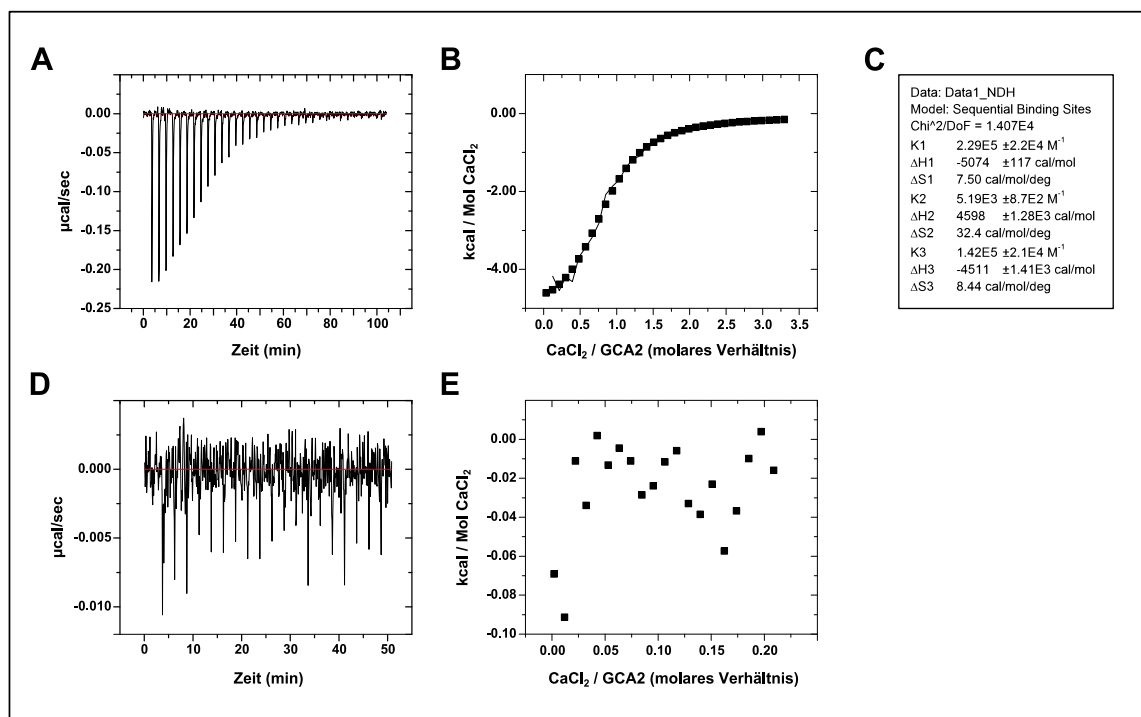


Abb. 3-12 ITC-Daten zur Bindung von Ca²⁺ an GCA2

A: Rohdaten der Titration von 1 mM CaCl₂ zu 45 µM GCA2 B: DeltaH-Darstellung der Integrierten Daten aus (A) C: Berechnete K_a-Werte der Calciumbindung an GCA2 für ein Modell mit drei Bindungsstellen D: Rohdaten der Kontrolltitration von 1 mM CaCl₂ zum Puffer aus (A) ohne GCA2 E: DeltaH-Darstellung der Integrierten Daten aus (D)

Wurde in der Messzelle GCA2-Protein vorgelegt und dann mit Calciumchlorid titriert, so war eine deutliche thermische Reaktion erkennbar (Abb. 3-12). Der erste Graph (Abb. 3-12A) zeigt die Rohdaten der Titration als Verlauf der Energiefreisetzung über die Zeit, wobei jeder Peak mit einer Injektion von 1 µL CaCl₂-Lösung (1mM) korrespondiert. Die zweite Kurve (Abb. 3-12B) wurde durch Integration der Peaks aus Abb. 3-12A erzeugt und zeigt die freigesetzte Energie pro Mol zugesetztem Calciumchlorid in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis zum GCA2-Protein. Aus diesen Kurven ist eine saturierbare Bindung des Liganden Ca²⁺ an das GCA2-Protein erkennbar. Anhand dieser Daten ist,

Ergebnisse

unter Zuhilfenahme eines Definierten Bindungsmodells, eine Berechnung der Assoziationskonstante K_a des GCA2-Calcium-Komplexes möglich. Obwohl CDPKs typischerweise über vier sequenziell calciumbindende EF-Hände verfügen, wurde hier zur Berechnung das Modell für drei sequenzielle Bindungsstellen zugrunde gelegt, da aufgrund der Aminosäuresequenz von GCA2 davon auszugehen war, dass die erste EF-Hand nicht in der Lage ist, Ca^{2+} -Ionen zu binden. Aus den so berechneten K_a -Werten wurden die typischerweise zur Charakterisierung von Bindungsaffinitäten herangezogenen Werte der Dissoziationskonstanten K_d berechnet. So ergeben sich K_d -Werte von $4,3 \pm 0,41 \mu\text{M}$, $192 \pm 32 \mu\text{M}$ und $7,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ für die erste, zweite und dritte Bindungsstelle. Bei der Titration des zur Dialyse der GCA2-Lösung verwendeten Puffers alleine, ohne GCA2-Protein, mit 1 mM Calciumchlorid war keine Reaktion erkennbar, woraus sich schließen ließ, dass die oben beschriebene Reaktion auf die Bindung von Calcium an GCA2 zurückzuführen war und nicht durch Kontaminationen der Proteinlösung mit Chelatoren hervorgerufen wurde. Die Rohdaten zu dieser Titration sind in Abb. 3-12D dargestellt, Abb. 3-12E zeigt diese Daten in DeltaH-Darstellung analog zu Abb. 3-12B.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die mutierte und somit potentiell nicht funktionale erste EF-Hand von GCA2 tatsächlich nicht in der Lage ist, Calciumionen zu binden. Hierzu wurden zwei Mutationen an den Positionen X und -Z (erste und letzte Aminosäure der calciumbindenden Schleife) in dieses EF-Hand-Motiv eingefügt, welche die Bindung von Calciumionen endgültig verhindern sollten. Analog wurden auch Mutationen in der potentiell funktionalen zweiten EF-Hand eingefügt, um zu verifizieren, dass diese Mutationen tatsächlich Einfluss auf die Calciumbindung durch GCA2 haben. Bei den eingefügten Mutationen handelte es sich jeweils um den Austausch der Asparaginsäure an Position 1 (X) der EF-Hand durch Alanin sowie der Glutaminsäure an Position 12 (-Z) der EF-Hand, welche in der ersten EF-Hand von GCA2 ohnehin bereits durch ein Glutamin substituiert ist, durch ein Lysin. Bevor diese Varianten von GCA2 zu ITC-Messungen eingesetzt wurden, wurde getestet, ob sie noch über eine calciumregulierte Kinaseaktivität verfügen.

Ergebnisse

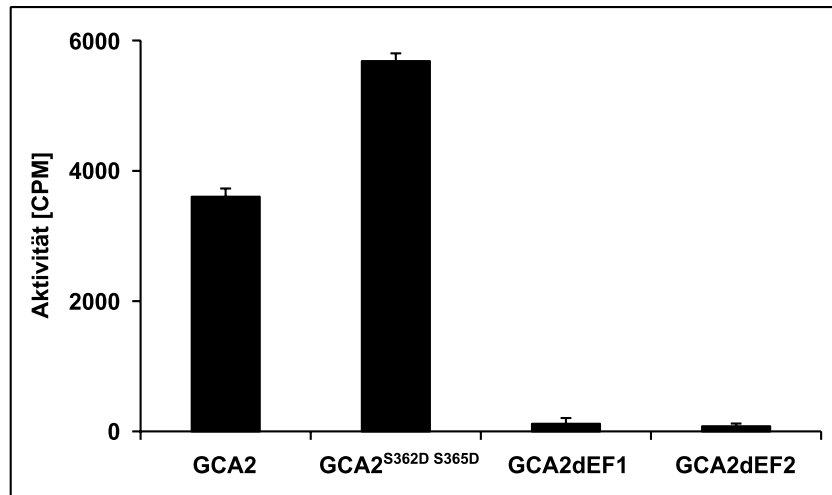


Abb. 3-13 Kinaseaktivität von GCA2-EF-Hand-Mutanten

Vergleich der Aktivität äquivalenter Mengen von GCA2 und der Phosphomimikmutante GCA2^{S362D S365D} mit GCA2-Mutanten deren erste (GCA2dEF1) bzw. zweite EF-Hand (GCA2dEF2) durch Punktmutationen (vgl. Text) so verändert wurden, dass sie nichtmehr in der Lage sind, Calciumionen zu binden. Die Säulen zeigen die Gesamtmenge an übertragener Radioaktivität aus γ -³²P-ATP auf die im Reaktionsansatz enthaltenen Proteine in Gegenwart von 10 μ M freiem Calcium. Als Substrat diente dephosphoryliertes Casein, n=3.

Hierbei stellte sich heraus, dass diese beiden Mutanten in vitro kaum noch Kinaseaktivität zeigten. Wie in Abb. 3-13 zu erkennen ist, lag die durch diese beiden Varianten übertragene Menge an radioaktiver Markierung selbst in Gegenwart von 10 μ M freiem Calcium mit 116 ± 88 CPM bzw. 79 ± 41 CPM für die in der ersten bzw. zweiten EF-Hand mutierten Version nur sehr knapp über dem Hintergrundlevel, während der WT mit 3600 ± 130 CPM sowie die Phosphomimikmutante GCA2^{S362D S265D} mit 5780 ± 120 CPM bei gleicher Proteinmenge ein mindestens 30-fach höheres Signal zeigten. Versuche, für diese GCA2-Varianten eine mögliche Calciumbindung zu bestimmen, brachten kein Ergebnis.

3.2.4. Regulation der Kinaseaktivität durch RCAR1

RCAR1 (regulatory component of ABA-receptor 1) zählt zu einer Genfamilie, die in Arabidopsis 14 Mitglieder in drei Subgruppen umfasst welche in Verbindung mit Proteinphosphatasen des Typs 2C als ABA-Rezeptoren fungieren. (vgl. 1.1.2). Aufgrund der bereits gezeigten physikalischen Interaktion von GCA2 mit RCAR1 (Korte 2009) und dem, auf der ABA-abhängigen Inhibierung der enzymatischen Aktivität der korrespondierenden PP2Cs beruhenden Mechanismus der Signalperzeption durch RCAR-Proteine wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass eventuell ein paralleler Mechanismus zur direkten Regulation der Kinaseaktivität von GCA2 bestehen könnte. Hierzu wurden GCA2 bzw. GCA2-VK mit Casein sowohl mit als auch ohne RCAR1 und Abscisinsäure inkubiert.

Ergebnisse

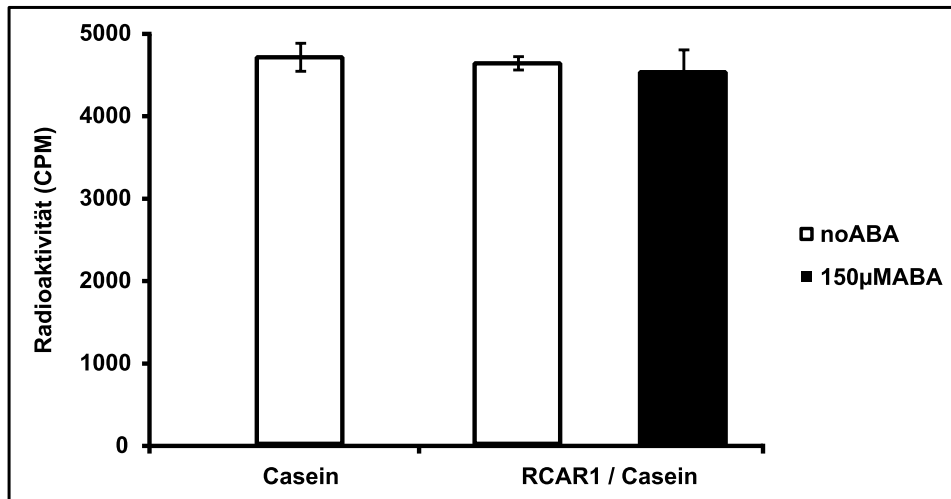


Abb. 3-14 Einfluss von RCAR1 auf die Kinaseaktivität von GCA2

Vergleich der Phosphorylierung von Casein durch GCA2-VK in Gegenwart und Abwesenheit von RCAR1 und ABA. Die Säulen zeigen die auf das Gesamtprotein übertragene Menge an Radioaktivität aus γ - 32 P-ATP. n=2

Abb. 3-14 zeigt repräsentativ das Ergebnis dieses Versuchs mit GCA2-VK. Es ist klar erkennbar, dass kein signifikanter Unterschied in der Kinaseaktivität zwischen den Ansätzen mit RCAR1 (sowohl mit als auch ohne 150 μ M ABA) und der Kontrolle ohne RCAR1 besteht. Somit ist davon auszugehen, dass keine direkte Regulation der Aktivität von GCA2 durch RCAR1 stattfindet.

3.2.5. Analyse der Phosphorylierung möglicher Substrate

Nach der Charakterisierung der calciumabhängigen Aktivierung der Kinaseaktivität von GCA2 mit Hilfe des unspezifischen Substrats Casein, wurde auch die Phosphorylierung möglicher natürlicher Substrate aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Hierzu wurden zum Einen Kandidaten herangezogen, die in früheren Interaktionsstudien als potentielle Interaktionspartner von GCA2 identifiziert wurden, zum Anderen wurden auch Proteine getestet, für die eine Rolle in der GCA2-abhängigen Signaltransduktion aufgrund des Phänotyps der *gca2-1*-Mutante in Betracht gezogen werden konnte.

3.2.5.1. RCAR

Wichtige Kandidaten für endogene Substrate von GCA2 waren vor Allem die RCAR-Proteine (regulatory component of ABA-receptor), insbesondere RCAR1 (vgl. 3.2.4); daher wurde als erstes getestet, ob dieses von GCA2 als Substrat akzeptiert wird. Hierzu wurde RCAR1 (4 μ M) mit GCA2 (2 μ M) in Gegenwart von 10 μ M freiem Calcium mit radioaktivem γ - 32 P-ATP inkubiert und die Proteine anschließend mittels SDS-PAGE getrennt. Die Phosphorylierung der Proteine wurde dann autoradiographisch visualisiert. Das Ergebnis ist anhand eines repräsentativen Autoradiogramms und der zugehörigen coomassiegefärbten Kontrolle in Abb. 3-15 A dargestellt. Die erste Spur zeigt den

Ergebnisse

Molekulargewichtsmarker (MBI Page Ruler prestained), welcher aufgrund fehlender radioaktiver Markierung im Autoradiogramm nicht sichtbar ist. Die zweite Spur zeigt die Autophosphorylierung der Kinase als sehr starkes Signal bei ca. 60 kD, weiterhin sind im Autoradiogramm leichte Banden um 40 kD sowie um 26 kD erkennbar, wobei nur die erste dieser Banden in der Coomassiefärbung erkennbar ist. Diese Signale sind auf Verunreinigungen in der GCA2-Lösung zurückzuführen. Die dritte Spur enthält zusätzlich RCAR1, welches in der Coomassiefärbung deutlich bei ca. 23 kD erkennbar ist, jedoch verursacht es kein signifikantes zusätzliches Signal im Autoradiogramm. Um zu testen, ob die Anwesenheit von RCAR1 die Transphosphorylierungsaktivität von GCA2 beeinflusst, wurde zusätzlich noch Casein (2 µg) in den Reaktionsansatz gegeben (Spur #4). Im Autoradiogramm ist, neben dem Signal der Kinase selbst, ein deutliches Signal im Bereich um 20-25 kD erkennbar, welches phosphoryliertem Casein entspricht. In der Coomassiefärbung ist hier zwar eine deutliche Bande für RCAR1 am unteren Ende des Bereichs der Caseinbanden erkennbar, jedoch führt dies auch hier zu keinem zusätzlichen Phosphorylierungssignal (vgl. Spur #7: GCA2 und Casein ohne RCAR1). Zusätzlich wurde in den Spuren #5 und #6 die zehnfache Menge (40 µM) RCAR1 eingesetzt, jedoch ist auch in diesem Fall keine Phosphorylierung von RCAR1 durch GCA2 erkennbar; lediglich die Gesamtintensität des Signals ist reduziert, was jedoch auf die Erhöhung der Salzkonzentration durch die große Menge an zugesetzter RCAR1-Lösung zurückzuführen ist.

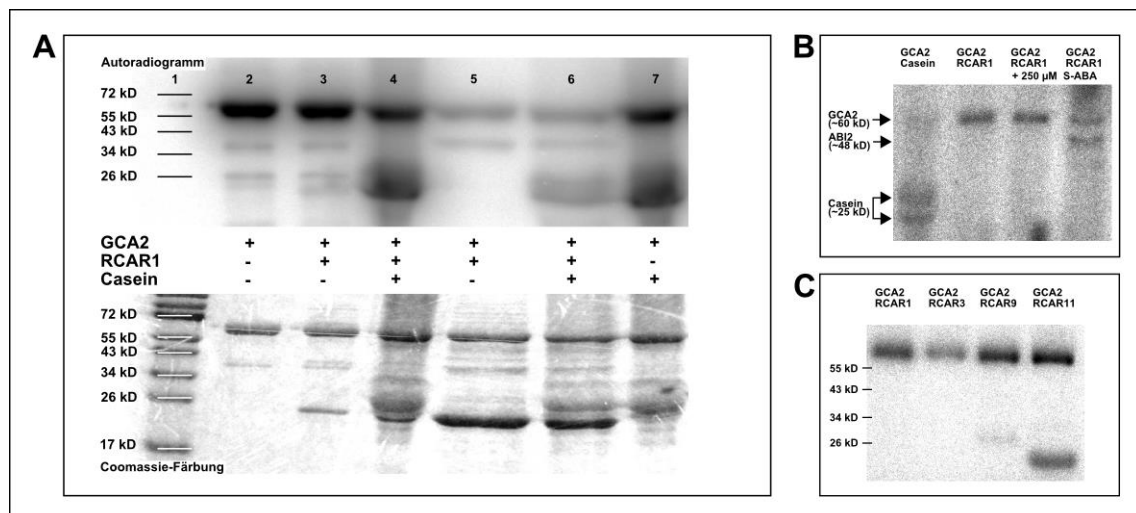


Abb. 3-15 Phosphorylierung von RCAR-Proteinen

A: Test auf Phosphorylierung von RCAR1 durch GCA2, Autoradiogramm (oben) und korrespondierendes mit Coomassie gefärbtes Kontrollgel (unten) GCA2: 2 µM, RCAR1: 4 µM bzw. 40 µM, Casein: 2 µg, freies Calcium: 10 µM. B: Test auf Phosphorylierung des ABA-Rezeptorkomplexes RCAR1/ABI2 durch GCA2. GCA2: 2 µM, RCAR1: 4 µM, ABI2: 2 µM, freies Calcium: 10 µM. C: Phosphorylierung verschiedener RCAR-Proteine durch GCA2. GCA2: 2 µM, RCARs: 4 µM, freies Calcium: 10 µM.

Ergebnisse

Nachdem gezeigt wurde, dass RCAR1 allein kein Substrat für GCA2 ist, wurde getestet, ob eventuell ein vollständiger Rezeptorkomplex aus RCAR1 und ABI2 durch GCA2 phosphoryliert werden kann. Das Ergebnis dieses Tests ist in Abb. 3-15 B dargestellt. Das Autoradiogramm zeigt von links nach rechts die Inkubation von GCA2 mit: Casein, RCAR1, RCAR1 und 250 μ M ABA sowie RCAR1 und ABI2 in Gegenwart von 250 μ M ABA. Auch in diesem Versuch konnte keine Phosphorylierung von RCAR1 erreicht werden, jedoch zeigte sich im Ansatz mit ABI2 eine Bande bei ca. 50 kD, die zu einer Phosphorylierung von ABI2 (ca. 48 kD) passt (vgl. 3.2.5.2).

Neben RCAR1 wurden auch RCAR3, RCAR9 und RCAR11 als potentielle GCA2-Substrate getestet. Für RCAR3 konnte ebenfalls keine Phosphorylierung nachgewiesen werden, allerdings werden die RCARs 9 und 11 von GCA2 als Substrat akzeptiert (Abb. 3-15 C)

Insgesamt wurden also Vertreter aus allen drei Untergruppen der RCAR-Familie getestet, von denen die RCARs 1 und 3, welche beide der Gruppe I angehören, in vitro nicht durch GCA2 phosphoryliert wurden, jedoch wurden RCAR9 (Gruppe II) und RCAR11 (Gruppe III) als Substrate akzeptiert.

3.2.5.2. PP2C

Nachdem in den Versuchen zur Phosphorylierung der RCARs eine Phosphorylierung der Proteinphosphatase ABI2 festgestellt werden konnte, wurden weitere Untersuchungen mit den PP2Cs ABI1, ABI2 und PP2CA durchgeführt.

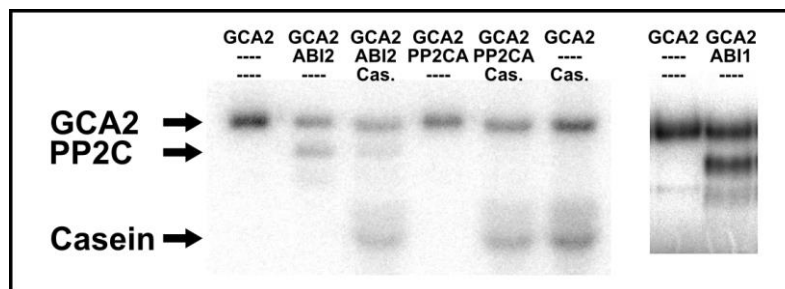


Abb. 3-16 Phosphorylierung verschiedener PP2Cs durch GCA2

Autoradiogramm der durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Reaktionsansätze. 1: GCA2 2: GCA2 + ABI2 3: GCA2 + ABI2 + Casein 4: GCA2 + PP2CA 5: GCA2 + PP2CA + Casein 6: GCA2 + Casein 7: GCA2 8: GCA2 + ABI1 Eingesetzte Proteinkonzentrationen: GCA2: 1,7 μ M ABI2: 0,4 μ M PP2CA: 0,2 μ M ABI1: 0,5 μ M

Abb. 3-16 zeigt die Phosphorylierung der Proteinphosphatasen ABI1, ABI2 und PP2CA durch GCA2. Die Spuren Nr. 1 und Nr. 7 zeigen die Autophosphorylierung der Kinase und Spur Nr. 6 zeigt die Phosphorylierung von Casein durch GCA2. Spur Nr. 2 und Nr. 3 zeigen die Reaktionsansätze mit GCA2 und ABI2, Spur 3 enthält zusätzlich noch Casein; eine Phosphorylierung von ABI2 ist in beiden Fällen erkennbar. Spur 4 zeigt lediglich ein

Ergebnisse

Signal für die Autophosphorylierung der Kinase, während Spur 5 zusätzlich auch noch ein Signal für Casein zeigt, obwohl in beiden Ansätzen PP2CA enthalten war, für die jedoch kein Signal erkennbar ist. In Spur Nr. 8 ist zusätzlich zur Autophosphorylierung von GCA2 noch ein deutliches Signal zu erkennen, welches der Phosphatase ABI1 zuzuordnen ist. GCA2 phosphoryliert also ABI1 und ABI2, jedoch nicht PP2CA.

3.2.5.3. Transkriptionsfaktoren

Zusätzlich zu den ABA-Rezeptorkomponenten wurden auch zwei, am ABA-Signalweg beteiligte Transkriptionsfaktoren als potentielle Substrate für GCA2 getestet, nämlich der AP2-Domänen-Transkriptionsfaktor ABR1 und der bZIP-Transkriptionsfaktor ABF1, welche beide wichtige Rollen in der ABA-abhängigen Genregulation spielen. Das Ergebnis der Inkubation von rekombinant exprimiertem ABF1 bzw. ABR1 mit GCA2 ist in Abb. 3-17 zu sehen.

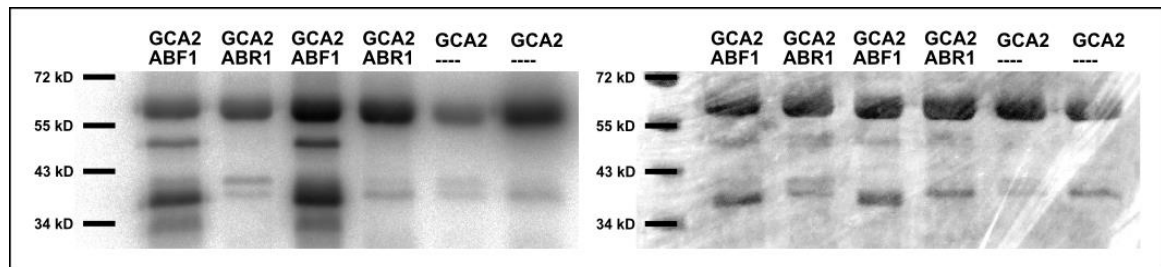


Abb. 3-17 Test auf Phosphorylierung von ABF1 und ABR1 durch GCA2

Inkubation von GCA2 mit ABF1 bzw. ABR1 in Gegenwart von 10 μ M freiem Calcium und 0,2 μ Ci γ - 32 P-ATP, aufgetrennt über SDS-PAGE (12%). Autoradiogramm des zuvor mit Coomassie-Brilliantblau gefärbten und getrockneten Gels (links) und Coomassiefärbung des selben Gels (rechts)

Die Proben mit ABF1 zeigen zwei deutliche radioaktiv markierte Banden, eine bei ca. 50 kD und die zweite bei ca. 37 kD, welche in den Autophosphorylierungskontrollen nicht vorhanden sind, während bei den Proben mit ABR1 als Substrat keine Signale erkennbar sind, die nicht auch in den korrespondierenden Kontrollspuren zu sehen sind. Somit ist GCA2 *in vitro* in der Lage ABF1 zu phosphorylieren, nicht jedoch ABR1.

3.2.6. Interaktion mit OST1 *in vitro*

Durch Experimente in *Arabidopsis*-Protoplasten wurde bereits durch A. Korte (Korte 2009) gezeigt, dass die Hyperstimulation der Expression ABA-induzierbarer Reporterkonstrukte, welche durch die Überexpression von RCAR1 oder RCAR3 erreicht wird, durch die Coexpression von GCA2 verhindert werden kann. Weiterhin wurde beobachtet, dass dieser Effekt durch die zusätzliche Expression von OST1 verringert werden kann. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass auch OST1 allein eine vergleichbare Verstärkung der ABA-Antwort bewirken kann und dass sich dieser Effekt durch die Coexpression von GCA2 reduzieren lässt. Abb. 3-18 zeigt, dass die Coexpression von

Ergebnisse

RCAR3 und OST1 im Protoplastensystem zu einer deutlichen Steigerung der ABA-Vermittelten Reporteraktivierung führt, welche bei 3 μM ABA das Achtfache der Kontrolle beträgt. Durch zusätzliche Expression der konstitutiv aktiven GCA2-VK lässt sich diese Aktivierung um das Zweifache reduzieren. Die kinaseinaktive GCA2-VK-TK zeigt hingegen keinerlei Effekt auf die durch RCAR3 und OST1 vermittelte Erhöhung der Reporteraktivität.

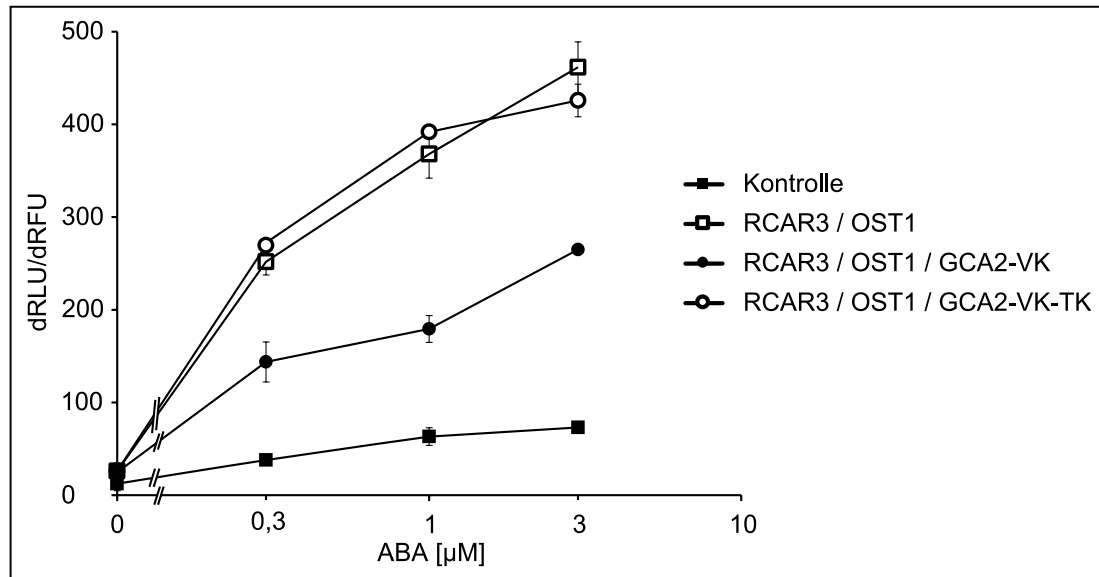


Abb. 3-18 Einfluss von GCA2 auf RCAR3 und OST1

Coexpression von RCAR3 und OST1 mit GCA2-VK und GCA2-VK-TK in *aba2*-Protoplasten. Aufgetragen ist die Aktivität des ABA-induzierbaren pRD29b::Luc-Reporters (normalisierte Luciferaseaktivität) in Abhängigkeit von der ABA-Konzentration im Inkubationsmedium. Zur Normalisierung diente die Aktivität des konstitutiv aktiven *p35S::GUS*-Reporters. Es wurden je 3 μg der Reporterplasmide, 1 μg *p35S::RCAR3*- und *p35S::OST1*-Plasmid sowie 4 μg *p35S::GCA2-VK*- bzw. *p35S::GCA2-VK-TK*-Plasmid eingesetzt. Die ABA-Applikation erfolgte nach 4 h phänotypischer Expression.

Aufgrund dieser antagonistischen Wirkung von OST1 und GCA2 im Protoplastensystem wurde die Möglichkeit einer direkten gegenseitigen Regulation dieser beiden Kinasen durch wechselseitige Phosphorylierung in Betracht gezogen. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden Kinaseaktivitätstests mit einer durch einen Aminosäureaustausch im katalytischen Zentrum inaktivierten Version (TK, „tote Kinase“) der jeweils anderen Proteinkinase als Substrat durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3-19 dargestellt.

Ergebnisse

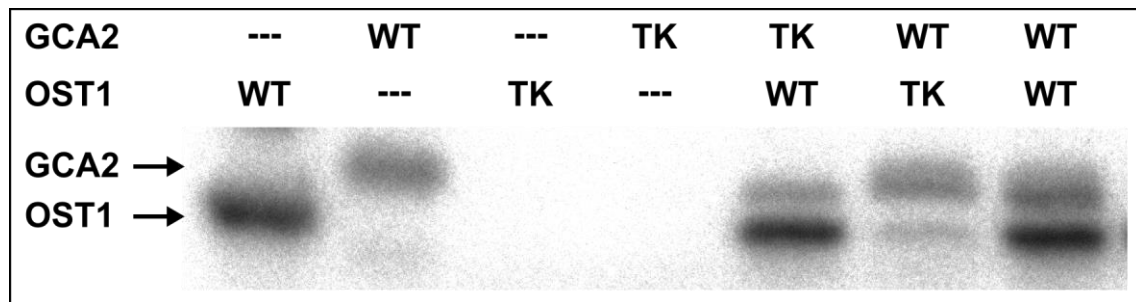


Abb. 3-19 Phosphorylierung von GCA2 durch OST1

Phosphorylierungstest mit aktiven (WT) sowie kinaseinaktiven (TK) Versionen von GCA2 und OST1 in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ und 2 mM MnCl₂, Konzentration der Proteinkinasen: 2 μM, ATP: 100 μM mit 0,2 μCi γ-³²P-ATP.

Die ersten beiden Spuren zeigen die Autophosphorylierung der beiden Kinasen während die beiden folgenden Spuren zeigen, dass GCA2-TK und OST1-TK keine Kinaseaktivität besitzen. Bei Inkubation von GCA2-TK mit aktivem OST1 war jedoch klar ein Phosphorylierungssignal für GCA2-TK erkennbar, was auf eine Phosphorylierung von GCA2-TK durch OST1 schließen lässt. Im Umgekehrten Fall war bei der Inkubation von OST1-TK mit aktivem GCA2 lediglich ein sehr schwaches Signal für OST1-TK erkennbar, eine Phosphorylierung von OST1-TK durch GCA2 ließ sich jedoch in weiteren Experimenten nicht zeigen. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Kinaseaktivität von OST1 gegenüber einem Peptidsubstrat (ABF1dLYSL, vgl. 3.3.1.3), welches nur durch OST1, nicht jedoch durch GCA2 phosphoryliert wird, durch die Anwesenheit von GCA2 eingeschränkt wurde, wenn beide Proteinkinasen vor der Zugabe des Substrats bereits in Gegenwart von ATP vorinkubiert wurden. Wurden beide Kinasen gemeinsam vorinkubiert, bevor das Substrat zugegeben wurde, zeigten sich keine Veränderungen in der Aktivität von OST1 im Vergleich zur Kontrolle ohne GCA2 (Abb. 3-20).

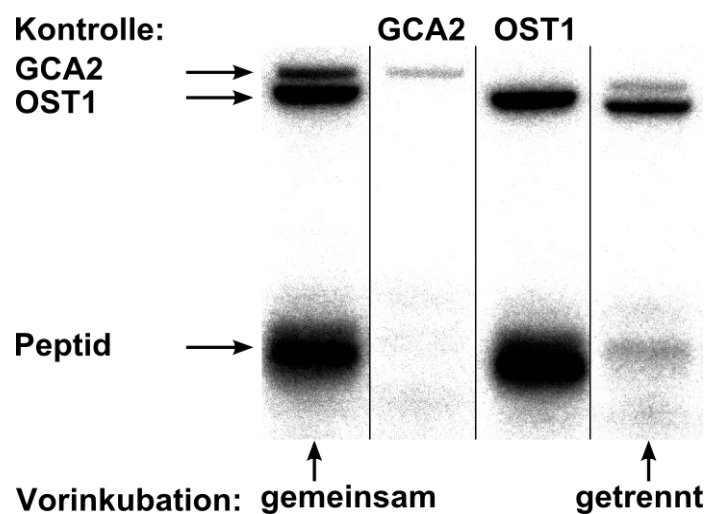


Abb. 3-20 Inaktivierung von OST1 durch GCA2

GCA2 und OST1 (je 2 μM) wurden sowohl gemeinsam als auch getrennt mit unmarkiertem ATP vorinkubiert. Nach 30 min wurden äquivalente Mengen GCA2 und OST1 gemischt und das Substrat zusammen mit γ-³²P-ATP zugegeben und weitere 30 min inkubiert.

3.3. Massenspektrometrische Phosphorylierungsanalyse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass GCA2 in vitro sowohl RCAR9 und RCAR11 als auch die Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 sowie den Transkriptionsfaktor ABF1 phosphoryliert, wurde die Phosphorylierung dieser Proteine mittels Massenspektrometrie untersucht. Die massenspektrometrische Analyse wurde im Rahmen einer Kooperation (DFG Forschergruppe FOR 964) durch die Arbeitsgruppe von Prof. M. Hippler an der WWU Münster durchgeführt. Zur Analyse der in vitro durch GCA2 phosphorylierten Proteine wurde eine angepasste Variante der SIMAC-Methode (*sequential elution from immobilized metal affinity chromatography*) (Thingholm *et al.* 2007) angewendet. Bei diesem Verfahren werden nach dem tryptischen Verdau der Probe die enthaltenen Phosphopeptide über eine IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*)-Säule gegenüber den unphosphorylierten Peptiden angereichert und durch die sequentielle Anwendung verschiedener Elutionsbedingungen zusätzlich in mono- und multiphosphorylierte Peptide aufgetrennt. Die Fraktionen, in denen sich die monophosphorylierten Peptide befinden, werden nochmals mittels Titandioxidchromatographie angereichert, während die Fraktion der multiphosphorylierten Peptide direkt zur Massenspektrometrie eingesetzt wird.

Die zu Untersuchenden Proteine wurden in vitro durch Inkubation mit GCA2 in Gegenwart von ATP und Calcium phosphoryliert (vgl. 2.3.14), wobei eine Markierungseffizienz zwischen 5 und 15% (berechnet auf ein Phosphat je Substratmolekül) erreicht wurde. Untersucht wurde die Phosphorylierung von ABI2, ABF1, RCAR9, RCAR11 sowie die Autophosphorylierung von GCA2 (vgl.3.2.5). Ebenfalls untersucht wurde die Phosphorylierung von kinaseinaktivem GCA2 durch OST1 (vgl. 3.5) sowie die Phosphorylierung von RCAR11 durch OST1. Für jede Probe wurde eine entsprechende Kontrolle mit einer inaktiven Version der jeweiligen Kinase als Vergleich herangezogen, um eventuell bereits während der Proteinexpression in *E. coli* eingeführte Phosphorylierungen auszuschließen.

3.3.1. Substratphosphorylierung durch GCA2

3.3.1.1. RCAR

Für die untersuchten RCAR-Proteine konnten trotz theoretisch ausreichender Phosphorylierungseffizienz keine für die jeweils verwendeten aktiven Kinasen spezifischen Phosphorylierungen nachgewiesen werden.

Ergebnisse

3.3.1.2. ABI2

In ABI2 wurden bei einer Sequenzabdeckung von 71% zwei Phosphorylierungsstellen gefunden, wobei die Position der modifizierten Aminosäure auf einem der beiden Phosphopeptide über die Massenspektrometrie nicht eindeutig festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von ABI2 sind in Abb. 3-21 anhand der Aminosäuresequenz dargestellt. Die erste der beiden gefundenen Phosphorylierungen konnte anhand der Massenspektren allerdings nicht eindeutig auf eine der drei möglichen Positionen Threonin⁹⁹, Serin¹⁰¹, und Serin¹⁰³ innerhalb des identifizierten monophosphorylierten Peptids festgelegt werden. Das zur zweiten möglichen Phosphorylierungsstelle Threonin²⁰⁰ korrespondierende Phosphopeptid wurde nur mit sehr geringer Häufigkeit gefunden.

1	MDEVSPAVAVPFRPFTDPHAGLRGYCNGESRVTLPESSCSGDGAMKDSSF
51	EINTRQDSLTSSSSAMAGVDISAGDEINGSDEFDPRSMNQSEKKVLSRTE
101	SRSLEFEKCVPLYGVTSICGRPEMEDSVSTIPRFLQVSSSSLLDGRVTN
151	GFNPHLSAHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALTEEIVKEKPEFCDGDT
201	WQEKWKKALFNSEFMRVDSEIETVAHAPETVGSTSVVAVVFPTHIFVANCG
251	DSRAVLCRGKTPLALSVDHKPDRDDEAARIEAAGGKVIWNGARVFGVLA
301	MSRSIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRVKEDDCLILASDGLWDVMTNEEVCD
351	LARKRILLWHKKNAMAGEALLPAEKRGEGKDPAAMSAEYLSKMALQKGS
401	KDNISVVVDLKGIRKFKSKSLN

Abb. 3-21 Phosphorylierungsstellen in ABI2

Darstellung der möglichen Phosphorylierungsstellen in ABI2 anhand der Aminosäuresequenz. Die mittels MS identifizierte Phosphopeptide sind grau hinterlegt, die jeweils als Phosphorylierungsstellen in Frage kommenden Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Grüner Text zeigt die Abdeckung der Proteinsequenz durch die insgesamt nachgewiesenen Peptide. Die markierten Aminosäuren sind T⁹⁹, S¹⁰¹, S¹⁰³ und T²⁰⁰.

Zur Klärung der genauen Lage der nicht eindeutig definierbaren Phosphorylierungsstelle wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (*site directed mutagenesis*; SDM) verschiedene Varianten des Proteins erstellt, in denen die in Frage kommenden Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden, um eine Phosphorylierung zu verhindern. Die Phosphorylierung dieser Varianten durch GCA2 wurde dann in Kinaseaktivitätstests mit radioaktiv markiertem ATP untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 3-22 anhand eines repräsentativen Autoradiogramms dargestellt. Der Austausch des Threonins an Position 99 (T⁹⁹) oder des Serins an Position 103 (S¹⁰³) zu Alanin bewirkte keine Signifikante Veränderung in der Phosphorylierung von ABI2 im Vergleich zum ABI2-Wildtyp, während der Austausch des Serins an Position 101 (S¹⁰¹) zu einer Reduktion des Signals auf Hintergrundniveau führte. Somit war davon auszugehen, dass ABI2 durch GCA2 hauptsächlich an dieser Stelle phosphoryliert wird.

Ergebnisse

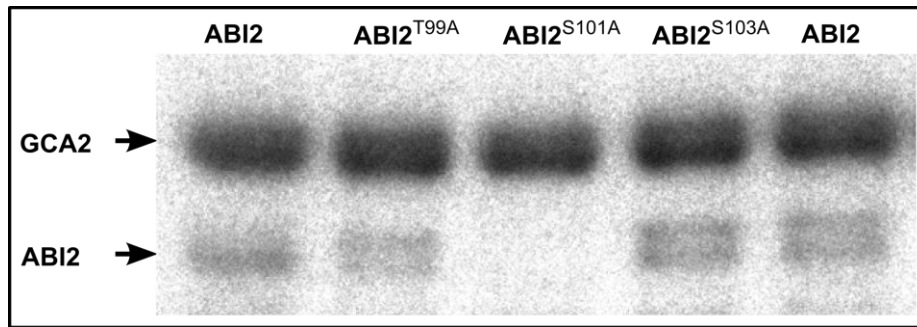


Abb. 3-22 Phosphorylierung verschiedener ABI2-Varianten

Autoradiogramm der Phosphorylierung verschiedener ABI2-Varianten (0,5 μ M) durch GCA2 (2 μ M) in Gegenwart von 10 μ M freiem Ca^{2+} und 100 μ M ATP sowie 0,5 μ Ci γ - ^{32}P -ATP.

3.3.1.3. ABF1

In ABF1 konnten ebenfalls zwei Phosphorylierungen nachgewiesen werden, einmal an einem Threoninrest an Position 135 des Proteins, sowie eine weitere, nicht eindeutig zuzuordnende Phosphorylierung im Bereich zwischen Position 27 und 31, in dem sich drei Serinreste sowie ein Tyrosinrest als möglicherweise modifizierte Aminosäuren befinden (vgl. Abb. 3-23).

1	MGTHIDINNLGGDTSRGNESKPLARQSSLYSLTFDELQSTLGEPEPKDFGS
51	MNMDELLKNIWTAEDTQAFMTTSSVAAPGPSGFVPGGNLQQRQGSLLTP
101	RTLSQKTVDEVWKYLNLSKEGSNGNTGTDALERQQTLGEMTLEDFLLRAGV
151	VKEDNTQQNENSSSGFYANNGAAGLEFGFGQPNQNSISFNGNNSMIMNQ
201	APGLGLKVGGMQOQQQPHQOQLQPHQRLPPTIFPKQANVTFAAPVNMV
251	NRGLFETSADGPANSNMGGAGGTVTATSPGTSSAENNTWSSPVPYVFRG
301	RRSNTGLEKVVERRQKRMIKNRESAARSRAKQAYTLELEAEIESLKLVN
351	QDLQKKQAEIMKTHNSELKEFSKQPPLAKRQCLRRTLTPW

Abb. 3-23 Phosphorylierungsstellen in ABF1

Darstellung der möglichen Phosphorylierungsstellen in ABF1, wobei rot hervorgehobene Aminosäuren mögliche Phosphorylierungsstellen darstellen. Der grau hinterlegte Bereich zeigt die den im Folgenden beschriebenen Peptiden zugrundeliegende Sequenz. Die rot markierten Aminosäuren sind S²⁷, S²⁸, Y³⁰ und S³¹.

In diesem Fall wurden zur Eingrenzung der Phosphorylierungsstelle auf S²⁷/S²⁸ oder Y³⁰/S³¹ zwei verschiedene synthetische Peptide verwendet, bei denen entweder die Serinreste an den Positionen 27 und 28 oder das Tyrosin und Serin an den Positionen 30 und 31 jeweils durch Alanin ersetzt wurden. Die Sequenzen der hierbei verwendeten Peptide sind KPLARQ**AA**LYSLTFDELQ (ABF1dQSSL) sowie KPLARQ**SS**L**AA**LTDELQ (ABF1dLYSL), wobei die als Phosphorylierungsstellen in Frage kommenden Aminosäuren fett markiert sind, während die in den synthetisierten Peptiden veränderten Aminosäuren in Rot dargestellt sind. Diese beiden Peptide wurden dann als Substrat für Kinaseaktivitätstests mit radioaktiv markiertem ATP eingesetzt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 3-24 dargestellt. Es wurde die Phosphorylierung der beiden Peptide durch GCA2 sowohl ohne als auch in Gegenwart von 10 μ M freiem Ca^{2+} bestimmt, als

Ergebnisse

Kontrolle wurde sowohl die Autophosphorylierung von GCA2 als auch die Phosphorylierung von Casein unter denselben Bedingungen herangezogen. Ohne Calcium lag die übertragene Radioaktivität der Reaktionen mit ABF1dQSSL als Substrat mit 220 ± 28 CPM etwa im Bereich der GCA2-Autophosphorylierung (242 ± 13 CPM) während mit 2115 ± 110 CPM zehnfach mehr Radioaktivität auf ABF1dLYSL übertragen wurde, während die Casein-Kontrolle eine Aktivität von 944 ± 58 CPM aufwies. In Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ freiem Calcium betrug die Autophosphorylierung 250 ± 17 CPM während sich die auf Casein übertragene Radioaktivität mit 2115 ± 97 CPM im Einklang mit den Ergebnissen aus 3.2.2 in etwa verdoppelt hatte. Die Aktivität der ABF1dQSSL-Proben zeigte mit 261 ± 30 CPM analog der GCA2-Autophosphorylierung keine Veränderung, während die Probe mit ABF1dLYSL als Substrat mit 2461 ± 60 CPM eine leichte Steigerung gegenüber der Messung ohne Calcium zeigte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass durch GCA2 das Serin an Position 27 und/oder das Serin an Position 28 in ABF1 phosphoryliert wird, nicht jedoch das Tyrosin oder Serin an Position 30 bzw. 31.

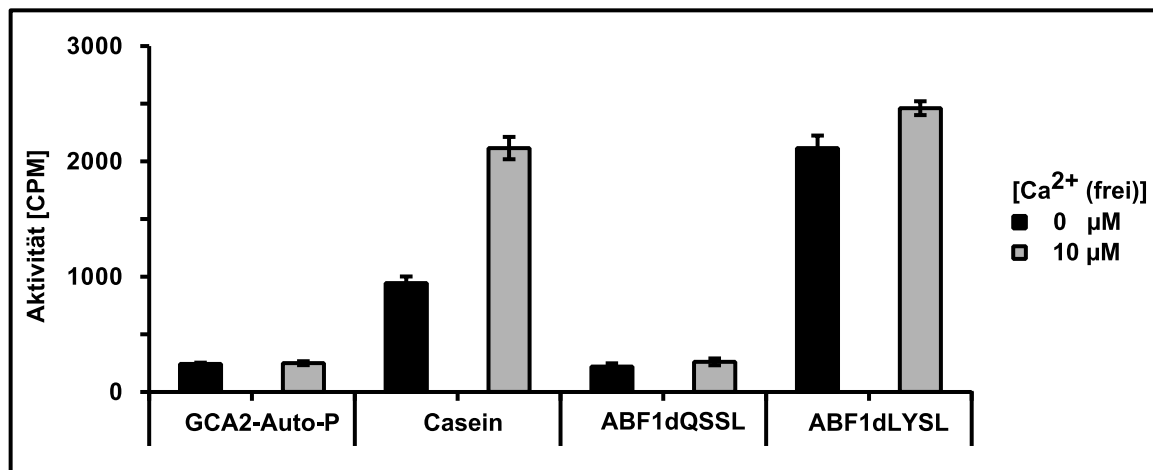


Abb. 3-24 Phosphorylierung von ABF1-Peptiden

In vitro-Phosphorylierung verschiedener Varianten eines ABF1-Peptids zur Eingrenzung der Lage einer Phosphorylierungsstelle. Die auf die Substrate übertragene Radioaktivität wurde nach Adsorption an Phosphocellulose durch Szintillationsmessung bestimmt (n=4)

3.3.2. GCA2-Autophosphorylierung und Phosphorylierung durch OST1

Die Ergebnisse der Massenspektrometrischen Untersuchung der *in vitro*-Autophosphorylierung von GCA2 sowie der Transphosphorylierung von GCA2-TK durch OST1 werden im folgenden Abschnitt zusammengefasst, da sich aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Kinasedomänen dieser beiden Kinasen (32% Identität der Aminosäuresequenz) eine große Überlappung in den Ergebnissen ergeben hat, welche in Abb. 3-25 anhand der Proteinsequenz von GCA2 dargestellt sind.

Ergebnisse

1 MGC FSSKHRK **T**QNDGGERTIPINPLQ**T**HIVDQVP**T**P**S**TPI**S**VRYPE**T**ILG
51 KGKALGILGKPFEDIRK**F**Y**S**LGKELGRGGLGITYMCKEISTGNNYACKSI
101 LKRKLISEQGREDEVKTEIQIMQHFLGQPNVVEIKGAYEDRQYIHLVMELC
151 AGGELFDRIIARGHYSERAAAGIIRSIVSVVQICHKLGVIHRDLKPENFL
201 FSSKEENAMLKV**T**DFGL**S**AFIEEGKVYQDVAG**S**PYYVAPEVLRRSYGKEI
251 DIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEIGIFDEILKCEIDFESQPWPSISESA
301 KDLVKKMLTEDPKRRI**T**AEQVLEHPWIKGGEAPDKPID**S**T**V**L**S**RMKQFRA
351 MNKLLKLLALKV**S**AV**S**L**S**EEEEIKGLK**T**LFANMD**T**NR**S**G**T**I**T**YEQ**L**Q**T**GL**S**R
401 LRSRLSETEVQQLVEASDVDGNG**T**IDYYEF**I**S**A**T**M**HRYKLHQDEHVHKAF
451 QHLDKDKNGHI**T**RDELE**S**AMKEYGMGDEA**S**IKEVI**S**EVDTDNDGKINFEE
501 FRAMMRCGTTQPKGKQYPFH
X: Phosphorylierung durch GCA2 und OST1
X: Phosphorylierung durch GCA2
X: Phosphorylierung durch OST1
X: Position der Phosphorylierungsstelle gesichert

Abb. 3-25 Phosphorylierungsstellen in GCA2

Darstellung der mittels Massenspektrometrie identifizierten Kandidaten für mögliche Phosphorylierungsstellen anhand der Proteinsequenz von GCA2. Markiert sind:

T¹¹, T¹⁹, T²⁷, T³⁵, S³⁷, S⁴⁰, T⁴⁶, S⁷⁰, T²¹³, S²¹⁸, S²³³, T³¹⁷, S³³⁹, T³⁴⁰, S³⁴³, S³⁶², S³⁶⁵, S³⁶⁷, T³⁷⁶, T³⁸³, S³⁸⁶, S³⁸⁸, S³⁹⁰, T³⁹⁶, T³⁹⁹, T⁴²⁴, S⁴³², T⁴³⁴, T⁴⁶², S⁴⁶⁸, S⁴⁸⁰, S⁴⁸⁶

So wurden 33 mögliche Autophosphorylierungsstellen in GCA2 identifiziert, sowie 18 durch OST1 phosphorylierbare Aminosäuren, wobei 14 dieser Kandidaten in beiden Untersuchungen gefunden wurden. Somit verbleiben noch 3 spezifisch durch OST1 phosphorylierte Aminosäuren, da zwei der vier nur mit OST1 gefundenen Kandidaten in der Sequenz von GCA2 direkt aufeinander folgen und es nicht möglich war, die Phosphorylierung spezifisch einer dieser Positionen zuzuordnen. In den Inaktiven Versionen von GCA2 und OST1 wurden keinerlei Phosphorylierungen gefunden, wodurch eine unspezifische Phosphorylierung dieser Proteine während der Expression in *E. coli* ausgeschlossen werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Autophosphorylierungsstellen S³⁶² und S³⁶⁵ sowie die OST1-Phosphorylierungsstellen T²¹³ und T³¹⁷ eingehender untersucht.

3.4. Auswirkungen der Phosphorylierung auf die Substrate

3.4.1. ABI2

Zur Untersuchung der Auswirkungen der gefundenen Phosphorylierungen auf die Aktivität von ABI2 wurden sowohl *in vitro* Phosphataseaktivitäts- und Regulationsstudien mit rekombinant exprimiertem ABI2 und verschiedenen RCAR-Proteinen als auch Versuche in *Arabidopsis*-Protoplasten durchgeführt. Hierzu wurden durch zielgerichtete Mutagenese verschiedene ABI2-Versionen generiert, in denen die entsprechenden Serin- bzw. Threoninreste entweder durch Alanin oder Asparaginsäure ersetzt wurden. Der Austausch zu Alanin hat zur Folge, dass das Protein an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden kann, während der Austausch zu Asparaginsäure durch die Einführung einer sauren Seitenkette, welche unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vorliegt, zur Anheftung einer negativen Ladung an das Protein führt und so den Effekt einer Phosphorylierung simuliert.

3.4.1.1. Untersuchung der Phosphataseaktivität *in vitro*

Um festzustellen, ob die unter 3.3.1.2 beschriebene Phosphorylierung der Proteinphosphatase ABI2 einen Einfluss auf deren enzymatische Aktivität oder die regulatorische Interaktion mit RCAR-Proteinen hat, wurden Phosphataseaktivitätstests mit dem Modellsubstrat Methylumbelliferylphosphat (MUP) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an RCAR1 und ABA nach (Ma *et al.* 2009) durchgeführt. Zuerst wurden die Aktivitäten der einzelnen Phosphomimikmutanten in Abwesenheit von RCAR und ABA bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 3-26 dargestellt. Es waren im Vergleich zum Wildtyp keine gravierenden Abweichungen in den Aktivitäten der einzelnen ABI2-Varianten erkennbar. Lediglich ABI2^{T99D} zeigte mit 352000 ± 31000 RFU/s eine um knapp das Zweifache geringere Aktivität als ABI2 mit 628000 ± 203000 RFU/s. ABI2^{S101A} sowie ABI2^{S101D} zeigten mit 611000 ± 44000 bzw. 561000 ± 81000 RFU/s eine sowohl dem Wildtyp ähnliche Aktivität als auch keinen signifikanten Unterschied zueinander. Im Fall von ABI2^{S103A} und ABI2^{S103D} lag die Aktivität der A-Variante mit 476000 ± 25000 bei 74% der D-Variante, welche mit 639000 ± 57000 RFU/s der Aktivität von ABI2 entsprach. Insgesamt zeigten sich also keine signifikanten Verschiebungen in der Phosphataseaktivität dieser ABI2-Varianten, insbesondere nicht für die Mutationen von Serin¹⁰¹, welches als die tatsächliche Phosphorylierungsstelle identifiziert wurde (vgl. 3.3.1.2).

Ergebnisse

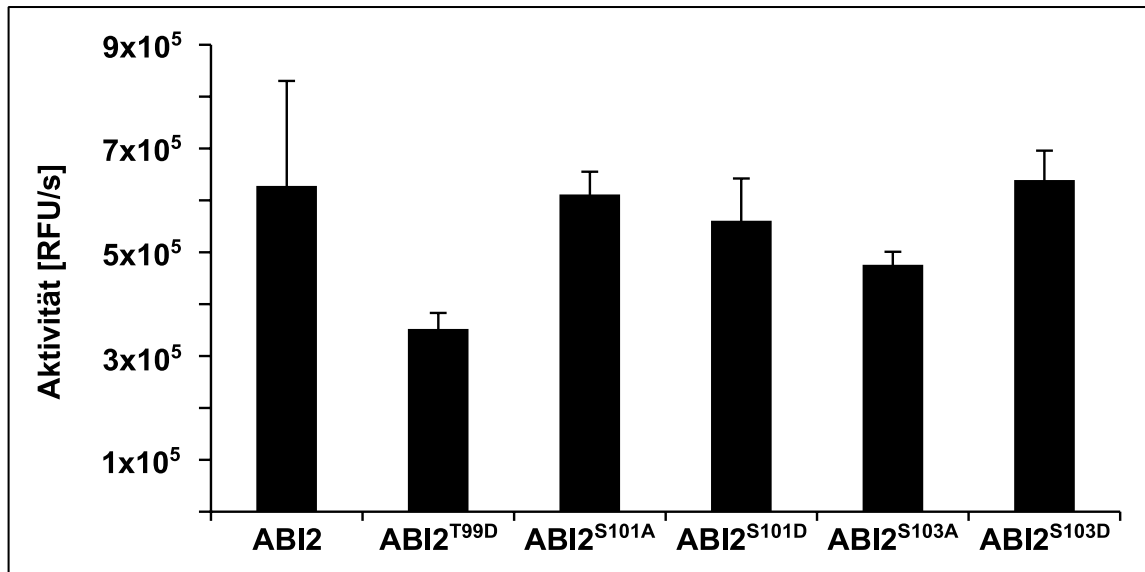


Abb. 3-26 Phosphataseaktivität von ABI2-Mutanten

Vergleich der Phosphataseaktivität verschiedener Phosphomimikmutanten von ABI2. Es wurden jeweils 200 ng Phosphatase pro Reaktionsansatz (Endkonzentration 50 nM) eingesetzt und die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit, welche in RFU/s (RFU: relative Fluoreszenzeinheiten) angegeben ist, bestimmt ($n \geq 3$).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2 durch RCAR1 und ABA durch die Phosphomimikmutationen beeinträchtigt ist. Hierzu wurde die Aktivität dieser ABI2-Varianten in Gegenwart einer konstanten Konzentration von RCAR1 bei steigender ABA-Konzentration im Reaktionsansatz bestimmt. Liegt ABI2 im Komplex mit RCAR1 vor, so ist die Phosphataseaktivität strikt durch S-ABA reguliert (Ma *et al.* 2009). Der Vergleich der Regulation der Aktivität von ABI2, ABI2^{T99D} ABI2^{S101D} (Abb. 3-27) und ABI2^{S103D} zeigte, dass die ABA-Abhängige Inhibierung dieser ABI2-Mutanten einen sehr ähnlichen Verlauf aufweist. ABI2^{S101D} und ABI2^{S103D} verhielten sich in diesem Versuch absolut identisch und zeigten eine halbmaximale Inhibierung bei ca. 160 nM S-ABA während ABI2^{T99D} bereits bei ca. 80 nM S-ABA zu 50% inhibiert war, was im Bereich des Wertes für den Wildtyp ($IC_{50} \sim 70$ nM) lag. Allerdings zeigte der ABI2-Wildtyp in diesem Experiment bei 30 nM S-ABA eine untypisch starke Inhibierung von 38% was in keinem der weiteren Versuche bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 3-28 und Abb. 3-29). ABI2^{T99D} zeigte bis zu einer Konzentration von 1 μ M S-ABA einen etwas schnelleren Anstieg der Inhibierung als die anderen getesteten ABI2-Varianten.

Ergebnisse

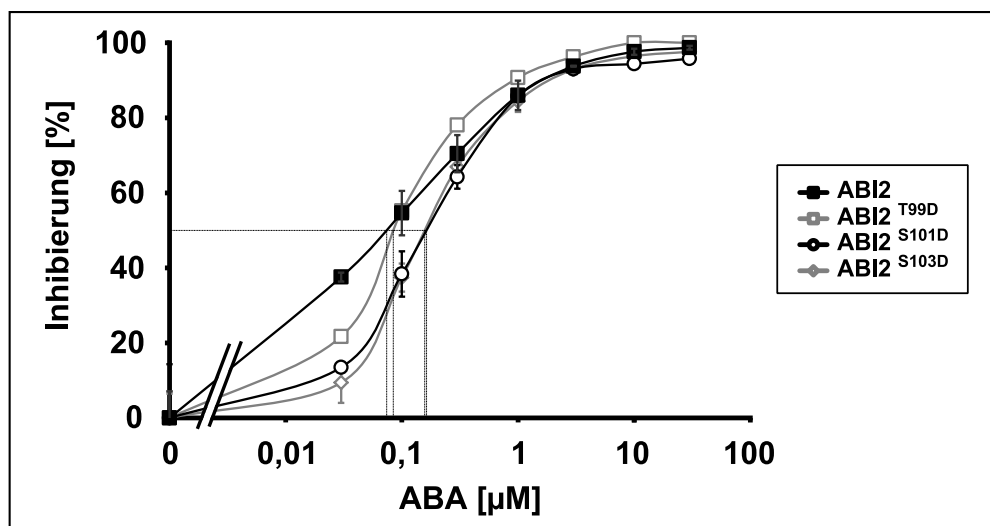


Abb. 3-27 Regulation der Aktivität verschiedener ABI2-Phosphomimic-Varianten

ABA-abhängige Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2, ABI2^{T99D}, ABI2^{S101D} und ABI2^{S103D} durch RCAR1. Das Diagramm zeigt die prozentuale Inhibition der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten S-ABA-Konzentration im Bereich von 0-30 μM. Die Konzentration der Phosphatase im Reaktionsansatz betrug 50nM, RCAR1 lag im zweifachen Überschuss vor (100 nM). Die gepunkteten Linien zeigen jeweils den Punkt der halbmaximalen Inhibition der Phosphatase.

In Abb. 3-28 ist der Vergleich der Regulation der Aktivitäten von ABI2, ABI2^{S101A} und ABI2^{S101D} dargestellt. Für den Fall einer regulatorischen Wirkung der Phosphorylierung dieses Serinrestes auf die Phosphataseaktivität von ABI2 wäre ein deutlicher Unterschied im Verhalten der A-Variante, welche den unphosphorylierten Zustand simuliert im Vergleich zur D-Variante, welche den phosphorylierten Zustand simuliert, zu erwarten gewesen. Es war jedoch kein signifikanter Unterschied in der Regulation dieser

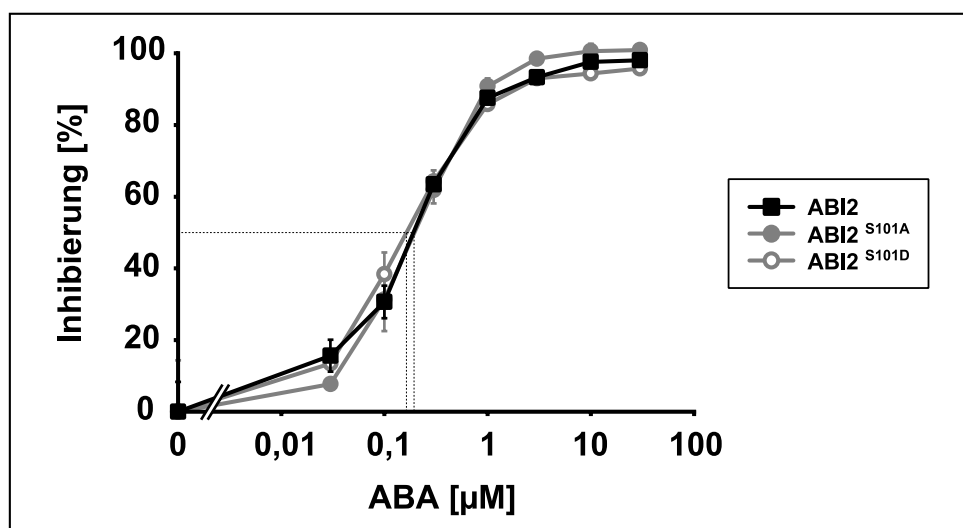


Abb. 3-28 Vergleich der ABA-Regulation von ABI2-WT, -S101A und -S101D

ABA-abhängige Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2, ABI2^{S101A} und, ABI2^{S101D} durch RCAR1. Das Diagramm zeigt die prozentuale Inhibition der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten S-ABA-Konzentration im Bereich von 0-30 μM. Die gepunkteten Linien zeigen jeweils den Punkt der halbmaximalen Inhibition der Phosphatase.

Ergebnisse

ABI2-Mutanten zu erkennen, weder im Vergleich untereinander noch im Vergleich zum ABI2-Wildtyp. ABI2^{S101D} zeigte in diesem Versuch einen IC₅₀-Wert von 150 nM S-ABA im Vergleich zu 200 nM für ABI2 und ABI2^{S101A}. Der Verlauf der Inhibierungskurven von ABI2 und ABI2^{S101D} war nahezu deckungsgleich, während die Inhibierung von ABI2^{S101A} anfänglich geringfügig langsamer verlief und dann etwas früher die maximale Inhibierung erreichte. Ein ähnliches Bild zeigte sich im Vergleich von ABI2, ABI2^{S103A} und ABI2^{S103D} (Abb. 3-29). Hier zeigte sich ebenfalls ein annähernd identisches Verhalten der Phosphatasen, lediglich bei niedrigen S-ABA-Konzentrationen bis 300 nM war ein etwas flacherer Verlauf der Kurven für die mutierten Versionen erkennbar, die IC₅₀-Werte betragen in diesem Versuch 230 nM für ABI2 und ABI2^{S103D} sowie 330 nM für ABI2^{S103A}.

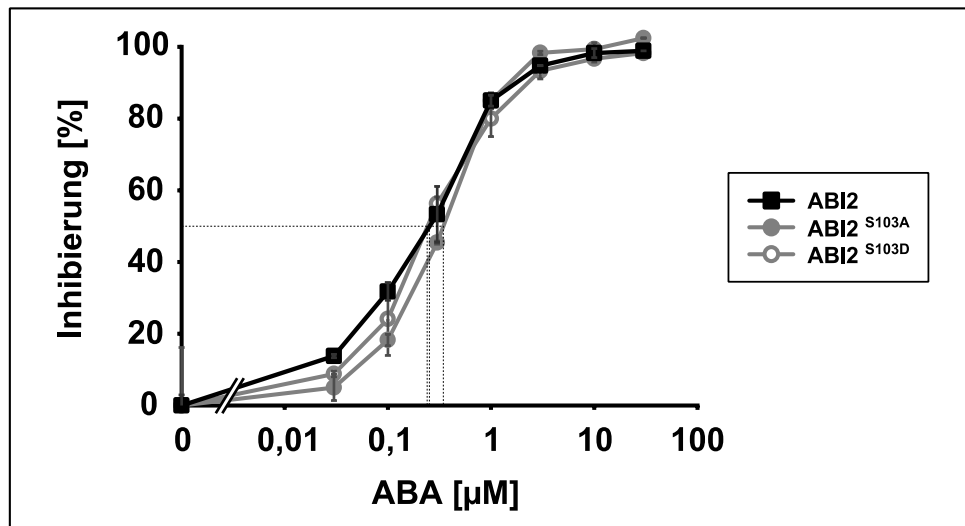


Abb. 3-29 Vergleich der ABA-Regulation von ABI2-WT, -S103A und -S103D

ABA-abhängige Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2, ABI2^{S103A} und, ABI2^{S103D} durch RCAR1. Das Diagramm zeigt die prozentuale Inhibierung der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten S-ABA-Konzentration im Bereich von 0-30 μM. Die gepunkteten Linien zeigen jeweils den Punkt der halbmaximalen Inhibierung der Phosphatase.

Die Untersuchung der ABA-abhängigen Regulation Phosphataseaktivität von ABI2^{S101A/T200A} sowie ABI2^{S101D/T200D}, in welchen neben Serin¹⁰¹ auch die zweite identifizierte Phosphorylierungsstelle, Threonin²⁰⁰, gegen Alanin bzw. Asparaginsäure ausgetauscht wurde, zeigte keine Unterschiede zu unmodifiziertem ABI2. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abb. 3-30. Der Verlauf der Inhibierung der Phosphataseaktivität mit steigender S-ABA-Konzentration war für beide Mutanten sowie den ABI2-Wildtyp annähernd identisch und zeigte keinerlei signifikante Unterschiede.

Ergebnisse

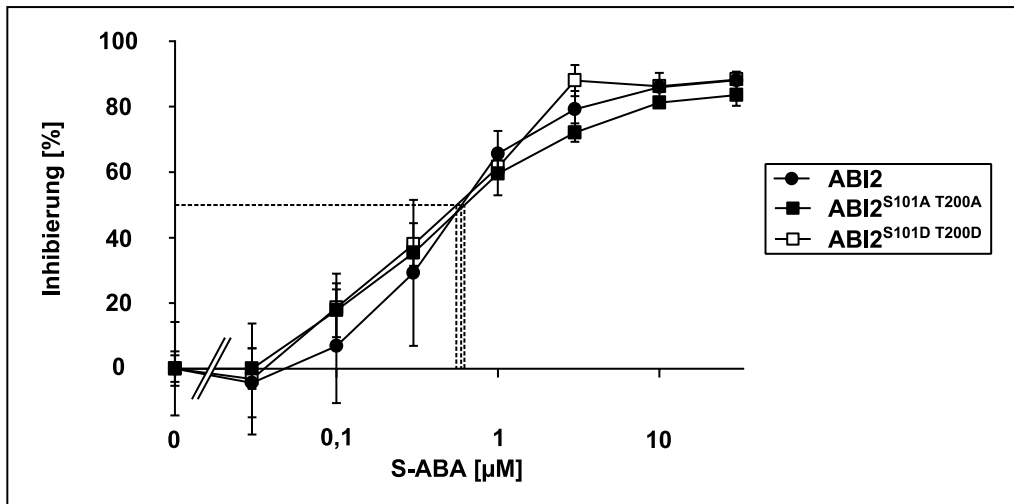


Abb. 3-30 Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2^{S101/T200}-Doppelmutanten

ABA-abhängige Regulation der Phosphataseaktivität durch RCAR1. Das Diagramm zeigt die prozentuale Inhibition der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten S-ABA-Konzentration im Bereich von 0-30 μM. Die gepunkteten Linien zeigen jeweils den Punkt der halbmaximalen Inhibition der Phosphatase.

Insgesamt ließ sich für die ABA-abhängige Regulation der getesteten ABI2-Mutanten keine signifikante Abweichung vom Verhalten des Wildtyps feststellen, alle beobachteten Unterschiede lagen im normalen Schwankungsbereich dieser *in vitro*-Tests.

3.4.2. ABF1

Zur Charakterisierung des Effekts der gefundenen Phosphorylierungen auf die Aktivität von ABF1 wurden, wie auch bei ABI2, mittels SDM verschiedene nichtmehr phosphorylierbare bzw. eine Phosphorylierung simulierende Versionen von ABF1 erstellt und ihr Effekt auf die ABA-Antwort durch transiente Expression in Arabidopsis-Protoplasten untersucht.

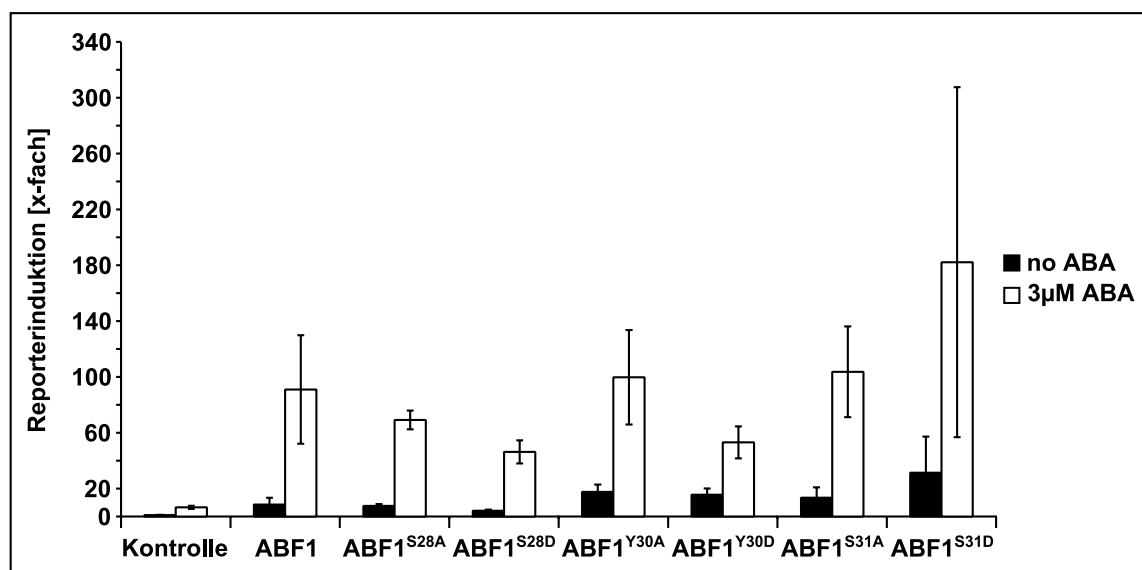


Abb. 3-31 Transiente Expression von ABF1 in Arabidopsis-Protoplasten

Effekt der Überexpression von ABF1-Phosphomimikmutanten auf die Expression des ABA-induzierbaren pRD29b::Luciferase-Reporters in Arabidopsis-Protoplasten des Ökotyps Ler. Die

Ergebnisse

Induktion mit 3 μ M S-ABA erfolgte 1h nach der Transfektion, die Inkubationszeit bis zur Messung betrug 12h. Zur Normalisierung der Luciferaseaktivität wurde der konstitutive p35S::GUS-Reporter eingesetzt, als Referenzwert zur Berechnung der Induktionsfaktoren wurde die normalisierte Luciferaseaktivität in der Kontrolle ohne ABA-Zugabe herangezogen.

Abb. 3-31 zeigt den Effekt der Expression von ABF1 sowie der ABF1-Mutanten ABF1^{S28A/D}, ABF1^{Y30A/D} und ABF1^{S31A/D} welche jeweils den unphosphorylierten (S/Y \rightarrow A) bzw. phosphorylierten (S/Y \rightarrow D) Zustand des ABF1-Proteins simulieren sollen, auf die ABA-abhängige Induktion des Luciferase-Reporters, welcher unter der Kontrolle des *RD29b*-Promotors steht. In der Vektorkontrolle bewirkt die Inkubation der Protoplasten mit 3 μ M S-ABA eine Steigerung der Reporteraktivität um den Faktor $6,6 \pm 1,1$. Bereits ohne ABA-Zugabe bewirkte ABF1 eine Erhöhung der normalisierten Luciferaseaktivität um den Faktor $8,5 \pm 4,9$, mit 3 μ M ABA betrug der Induktionsfaktor 91 ± 39 . ABF1^{S28A} zeigt sowohl mit ($69 \pm 6,7$) als auch ohne ABA ($7,6 \pm 1,3$) eine dem WT vergleichbare Aktivität, während ABF1^{S28D} in beiden Fällen eine gegenüber dem WT um ca. 50% reduzierte Aktivität zeigt ($4,2 \pm 0,7$ bzw. $46 \pm 8,3$). Das Gleiche gilt bei Inkubation der Protoplasten mit 3 μ M ABA auch für ABF1^{Y30A} und ABF1^{Y30D} mit $99,7 \pm 33,9$ bzw. $53,1 \pm 11,5$ -facher Induktion. Ohne ABA ist jedoch die Aktivität dieser beiden ABF1-Varianten mit $17,6 \pm 5,3$ - bzw. $15,6 \pm 4,5$ -facher Induktion um das Zweifache höher als für unmodifiziertes ABF1 ($8,5 \pm 4,9$). ABF1^{S31A} zeigt mit $13,5 \pm 7,4$ - bzw. $103,7 \pm 32,6$ -facher Induktion ohne bzw. mit 3 μ M S-ABA einen WT-ähnlichen Effekt, ABF1^{S31D} hingegen zeigt sowohl ohne ABA mit $31,4 \pm 25,9$ - als auch mit 3 μ M ABA mit $182,2 \pm 125,4$ -facher Induktion eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Aktivität. Allerdings zeigten alle Messungen mit Überexpression von ABF1, insbesondere bei Induktion mit ABA, eine sehr hohe Standardabweichung. Weiterhin zeigten die unter 3.2.5.3 beschriebenen Kinaseaktivitätstests mit synthetischen ABF1-Peptiden, dass Y30 und S31 nicht als Phosphorylierungsstellen in Betracht kommen, da das korrespondierende Peptid nicht durch GCA2 phosphoryliert wurde.

3.5. Phosphoregulation von GCA2

3.5.1. Autophosphorylierung

In Zuge der Untersuchungen zur Phosphorylierung der verschiedenen Substrate durch GCA2 sowie der Phosphorylierung von GCA2 durch die SnRK OST1 wurden auch Autophosphorylierungsstellen von GCA2 erfasst (vgl. 3.3.2). Von den so erfassten 33 möglichen Autophosphorylierungsstellen wurden die Serine an den Positionen 218, 362 und 365 als die am Besten abgesicherten Kandidaten einer weiteren Untersuchung unterzogen. Serin²¹⁸ befindet sich in einem Teil der Kinasedomäne, welcher als sogenannter *activation-loop* sehr stark konserviert ist, und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Kinasefunktion spielt. Serin³⁶² sowie Serin³⁶⁵ befinden sich in der

Ergebnisse

autoinhibitorisch wirkenden *junction-domain*, welche die Kinasedomäne mit der regulatorischen calmodulinartigen Domäne verbindet und somit ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von CDPKs spielt. Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste Einfluss auf die Aktivität von GCA2 *in vitro* hat, wurden durch Austausch der Serinreste zu Alanin bzw. Asparaginsäure GCA2-Mutanten generiert, die den unphosphorylierten bzw. phosphorylierten Zustand simulieren sollten. Leider erwies sich die Expression sämtlicher GCA2-Varianten, welche einen S²¹⁸D-Austausch enthielten in *E. coli* als sehr schwierig, es ließen sich in diesen Fällen nur sehr geringe Mengen löslichen Proteins isolieren, welche dann in Kinaseaktivitätstests keine Aktivität zeigten. Daher konnte keine Aussage zur Aktivität von GCA2^{S218D}-Mutanten *in vitro* getroffen werden.

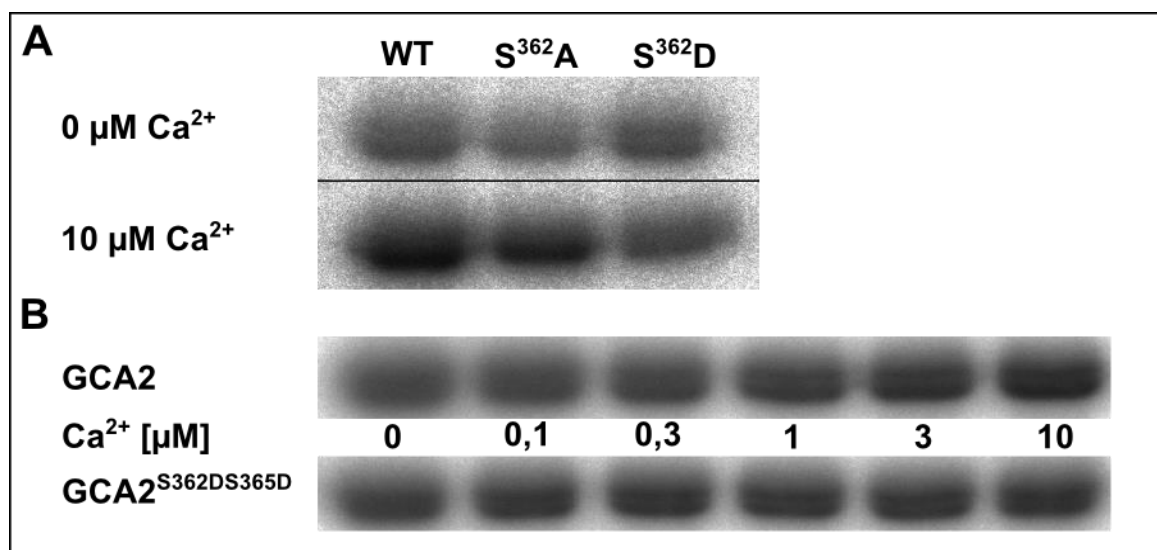


Abb. 3-32 Autophosphorylierung von GCA2^{S362} und GCA2^{S365}-Phosphomimic-Mutanten
Autophosphorylierung von GCA2, GCA2^{S362A} und GCA2^{S362D} ohne Calcium sowie mit 10 μM freiem Calcium (A). Calciumabhängigkeit der Autophosphorylierung von GCA2 im Vergleich zu GCA2^{S362D S365D} (B).

Der Austausch von S³⁶² durch Alanin führte sowohl mit als auch ohne freies Calcium im Reaktionspuffer zu einer leichten Reduktion der Kinaseaktivität im Vergleich zu GCA2, hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Erhöhung der Kinaseaktivität in Gegenwart von 10 μM freien Calciumionen. Die Aktivität von GCA2^{S362D} hingegen zeigte ohne Calcium keinen signifikanten Unterschied zur Aktivität von GCA2, allerdings führte in diesem Fall die Erhöhung der freien Calciumkonzentration nicht zu einem Anstieg der Autophosphorylierung (Abb. 3-32 A). Abb. 3-32 B zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Calciumabhängigkeit der Autophosphorylierung der Doppelmutante GCA2^{S362D S365D} im Vergleich zu GCA2, im Gegensatz zum Austausch von S³⁶² allein führte diese Doppelmutation jedoch nicht zu einem Ausfall der Regulation durch Calcium, sondern zu einer leichten Erhöhung der Aktivität ohne Calcium bei gleichzeitiger geringer Reduktion der Aktivität in Gegenwart von 10 μM freiem Calcium im Vergleich zu GCA2 in

Ergebnisse

Verbindung mit einem schnelleren Verlauf der Aktivierung. Bezüglich der Substratphosphorylierung zeigte GCA2^{S362D S365D} in Gegenwart von 10 µM freiem Calcium mit Casein als Substrat eine gegenüber GCA2 leicht (1,6-fach) erhöhte Aktivität (vgl. hierzu Abb. 3-13).

3.5.2. Phosphorylierung von GCA2 durch OST1

Eine wichtige Frage bei der Untersuchung der Interaktion von GCA2 und OST1 *in vitro* war, ob die Phosphorylierung von GCA2 durch OST1 ebenso ABA-abhängig durch PP2Cs reguliert wird, wie die Phosphorylierung des Anionenkanals SLAC1 durch OST1 und CPK23, wobei es sich um das *Columbia*-Ortholog zu GCA2 handelt. (Geiger *et al.* 2010). Für diese Kinasen wurde gezeigt, dass ihre Aktivität gegenüber SLAC1 durch ABI1 unterdrückt wird. Die *in-vitro*-Phosphorylierungsstudien zum Einfluss des ABA-Rezeptorkomplexes auf die SLAC1-Phosphorylierung in (Geiger *et al.* 2010) wurden in Zusammenarbeit mit S. Scherzer durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Kinasen in Gegenwart des ABA-Rezeptorkomplexes aus ABI1 und RCAR1 durch ABA, welches an den Rezeptorkomplex bindet und so die Phosphatase inaktiviert, aufgehoben werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für GCA2 ebenfalls gezeigt werden, dass die Gegenwart von aktivem ABI1 bzw. ABI2 zu einer Unterdrückung der Transphosphorylierungsaktivität von GCA2 führt, allerdings wurde hier das aus ABF1 abgeleitete Peptid „ABF1-dLYSL“ (vgl. 3.3.1.3) als Substrat eingesetzt. In Abb. 3-33 ist exemplarisch das Ergebnis dieses Versuchs für die Kombination GCA2/ABI2/RCAR11 dargestellt.

Ergebnisse

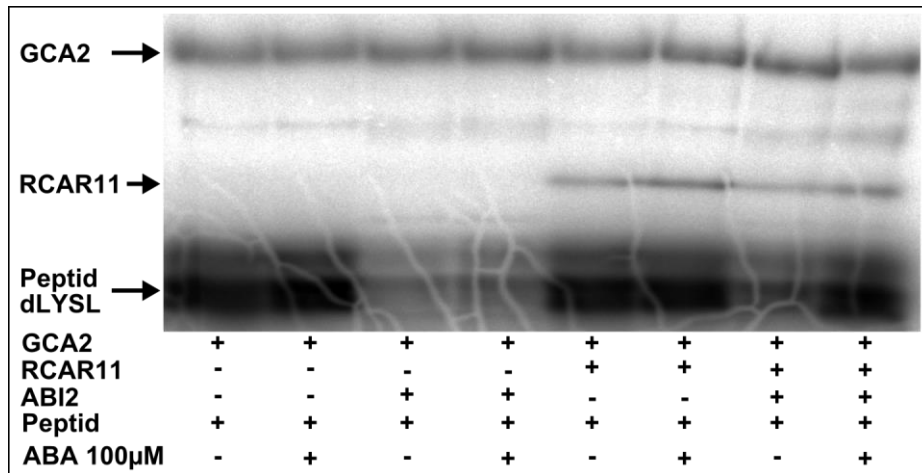


Abb. 3-33 ABA-abhängige Regulation der Kinaseaktivität von GCA2 durch ABI2 und RCAR11 in vitro Autoradiogramm der Phosphorylierung des ABF1-basierten Peptids ABF1-dLYSL durch GCA2 in Gegenwart von RCAR11 und ABI2 mit und ohne 100 μM S-ABA sowie den entsprechenden Kontrollen für den Effekt der einzelnen Komponenten auf die Kinaseaktivität von GCA2. GCA2: 1 μM; Peptid: 1 μg; RCAR11: 5 μM; ABI2: 1 μM freies Calcium: >30 μM, 2mM MnCl₂.

Analog zu dieser Rekonstruktion der SLAC1-Aktivierung *in vitro* wurde auch die Phosphorylierung von GCA2 durch OST1 in Gegenwart des ABA-Rezeptorkomplexes aus RCAR11 und ABI2 untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3-34 zusammengestellt. Kinaseinaktives GCA2 (GCA2-TK) wurde mit OST1 in Gegenwart von ABI2 und RCAR11 mit γ -³²P-ATP sowohl mit als auch ohne 100 μM S-ABA inkubiert und die Reaktionsansätze anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es zeigte sich, dass S-ABA allein keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von GCA2-TK durch OST1 hatte (erste und zweite Spur). Ebenso zeigte sich kein Einfluss von RCAR11 allein (Spur 3) und RCAR11 in Verbindung mit ABA (Spur 4) auf die Phosphorylierung von GCA2, allerdings zeigte sich in diesen Spuren eine deutliche Phosphorylierung von RCAR11 durch OST1 unabhängig von der Anwesenheit von ABA. Die Anwesenheit von ABI2 im Reaktionsansatz hatte, unabhängig von ABA, eine sehr starke Reduktion der Phosphorylierung zur Folge (Spur 5 und 6). Der vollständige Rezeptorkomplex aus RCAR11 und ABI2 bewirkte eine zur alleinigen Anwesenheit von ABI2 identische Reduktion der GCA2-Phosphorylierung, welche sich jedoch durch die Zugabe von 100 μM S-ABA vollständig aufheben ließ. Interessanterweise betraf die Wiederherstellung der Aktivität von OST1 durch ABA nur die Phosphorylierung von GCA2-TK, die Aktivität gegenüber RCAR11 war auch unter diesen Bedingungen weiterhin stark reduziert.

Ergebnisse

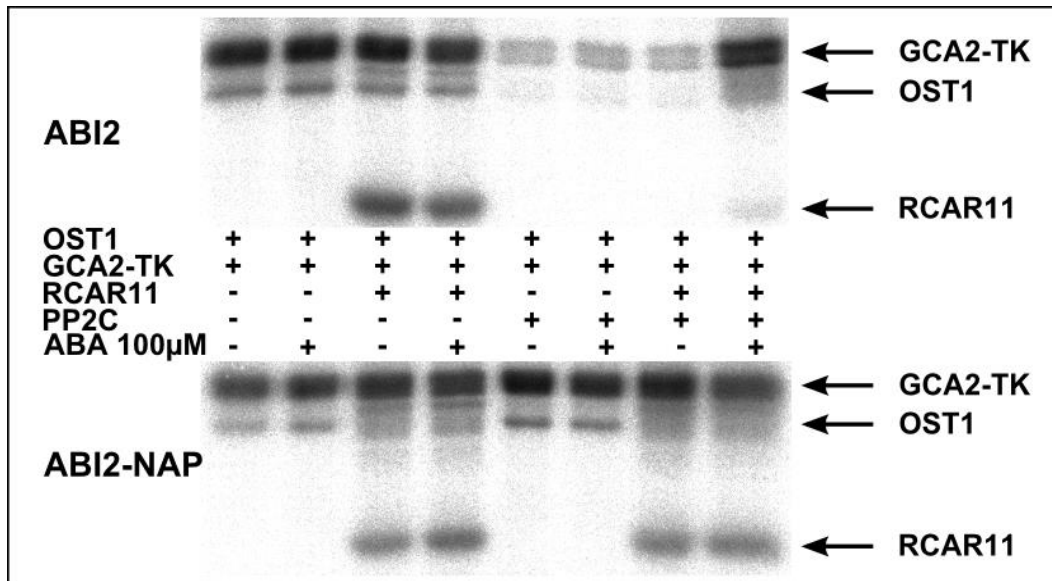


Abb. 3-34 ABA-regulierte Phosphorylierung von GCA2 durch OST1 *in vitro*

Autoradiogramm der Phosphorylierung von GCA2-TK durch OST1 in Gegenwart von RCAR11 und ABI2 bzw. ABI2-NAP (inaktive Phosphatase) mit und ohne 100 µM S-ABA sowie die entsprechenden Kontrollen für den Effekt der einzelnen Komponenten auf die Kinaseaktivität von OST1. GCA2: 1 µM; OST1: 1 µM; RCAR11: 5 µM; ABI2 / ABI2-NAP: 1 µM freies Calcium: >30 µM, 2mM MnCl₂.

Das untere Autoradiogramm zeigt das Ergebnis eines identisch aufgebauten Versuchs, jedoch wurde hier statt ABI2 eine inaktive Variante von ABI2 (ABI2-NAP) verwendet, die aufgrund einer Punktmutation im aktiven Zentrum (D¹⁶⁵->A) keine Phosphataseaktivität mehr besitzt. Diese Variante von ABI2 zeigte keinerlei Effekt mehr auf die Aktivität von OST1, woraus sich schließen lässt, dass die Phosphataseaktivität für die Regulation der Aktivität von OST1 erforderlich ist. Dies deckt sich mit dem mittlerweile von Ng *et al.* aufgeklärten Mechanismus der Regulation der Kinaseaktivität von OST1 (Ng *et al.* 2011). Um zu klären, ob die durch OST1 vermittelte Phosphorylierung von GCA2 Einfluss auf dessen Aktivität hat, wurden Phosphomimikmutanten für die gefundenen Phosphorylierungsstellen generiert und deren Kinaseaktivität *in vitro* untersucht. Nach Austausch des Serinrests an Position 317 zu Alanin zeigte sich eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität bezüglich der Phosphorylierung von Casein, während der Ersatz dieses Serins durch Asparaginsäure eine klare Reduktion der Caseinphosphorylierung durch GCA2 zur Folge hatte, während die Autophosphorylierung von GCA2 in beiden Fällen weitgehend unbeeinflusst blieb. In Abb. 3-35 ist die Aktivität dieser GCA2-Varianten anhand der auf das Substrat übertragenen Radioaktivität dargestellt.

Ergebnisse

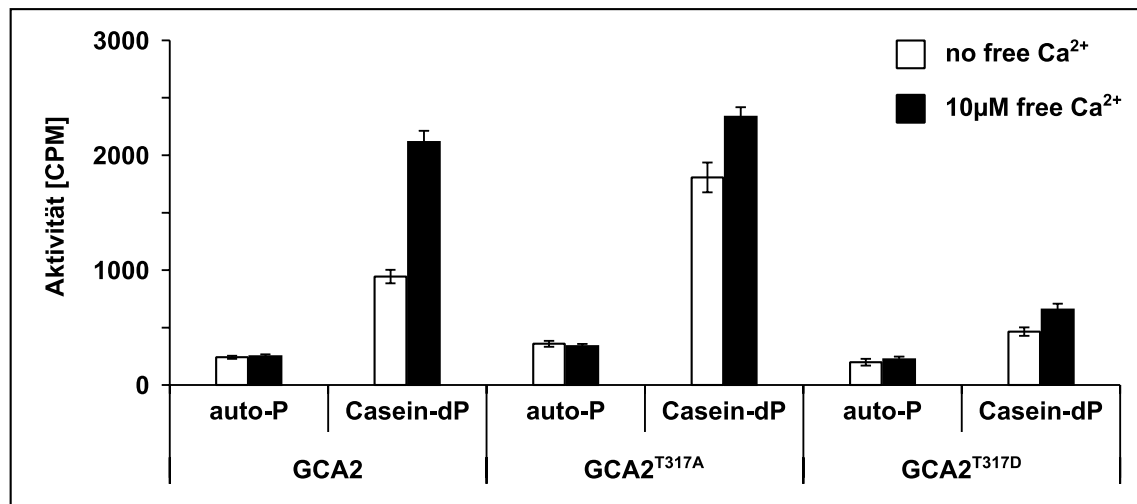


Abb. 3-35 Aktivität von GCA2^{T317}-Mutanten gegenüber Casein

Phosphorylierung von Casein durch GCA2, GCA2^{T317A} und GCA2^{T317D} mit und ohne 10 μM freien Ca²⁺-Ionen im Reaktionsansatz. Als Maß für die Phosphorylierung dient die auf das Substrat übertragene Radioaktivität aus γ-³²P-ATP. Alle GCA2-Varianten wurden in einer Konzentration von 1,4 μM eingesetzt.

Die Autophosphorylierung von GCA2 lag ohne Calcium bei 242 ± 13 CPM und mit 10 μM freiem Ca²⁺ bei 250 ± 17 CPM. Die Autophosphorylierung von GCA2^{T317A} zeigte sich mit 359 ± 26 CPM bzw. 339 ± 20 CPM ebenfalls calciumunabhängig und gegenüber dem Wildtyp um ca. 50% erhöht, während GCA2^{T317D} mit 200 ± 30 CPM bzw. 223 ± 26 CPM dasselbe Verhalten zeigte wie GCA2. Entgegen des Befundes für die Autophosphorylierung zeigte die Phosphorylierung von Casein durch GCA2 mit 2115 ± 97 CPM in Gegenwart von 10 μM freiem Calcium gegenüber 944 ± 58 CPM ohne Calcium die aufgrund der Ergebnisse aus 3.2.2 zu erwartende Aktivierung durch Calcium mit einem Induktionsfaktor von 2,24. GCA2^{T317A} verhielt sich in Gegenwart von Calcium mit einer Aktivität von 2336 ± 82 CPM wie GCA2 zeigte jedoch ohne Calcium mit 1807 ± 130 CPM eine gegenüber dem Wildtyp um das 1,9-Fache höhere Grundaktivität und lediglich eine 1,3-fache Induktion durch Calcium. Bezüglich der Aktivierung durch Calcium verhielt sich GCA2^{T317D} mit einer 1,4-fachen Steigerung der Kinaseaktivität wie GCA2^{T317A} jedoch fiel die Aktivität von GCA2^{T317D} mit 655 ± 52 CPM mit sowie 466 ± 37 CPM ohne Calcium um das 3- bzw. 2-Fache geringer aus, als bei GCA2. Bei der Verwendung des von ABF1 abgeleiteten Peptids ABF1dLYSL (vgl. 3.3.1.3) zeigte sich in Gegenwart von 10 μM freiem Calcium mit Aktivitäten von 2461 ± 60 CPM für GCA2, 2692 ± 111 CPM für GCA2^{T317A} sowie 1509 ± 253 CPM für GCA2^{T317D} ein ähnliches Bild (Abb. 3-36), lediglich der Unterschied in der Aktivität von GCA2 und GCA2^{T317D} fiel hier mit einem Faktor von 1,6 deutlich geringer aus, als bei der Verwendung von Casein als Substrat, was möglicherweise auf die im Vergleich zu Casein sehr geringe Größe des Peptids und die damit einhergehenden Unterschiede in der Enzym-Substrat-Interaktion zurückzuführen sein könnte.

Ergebnisse

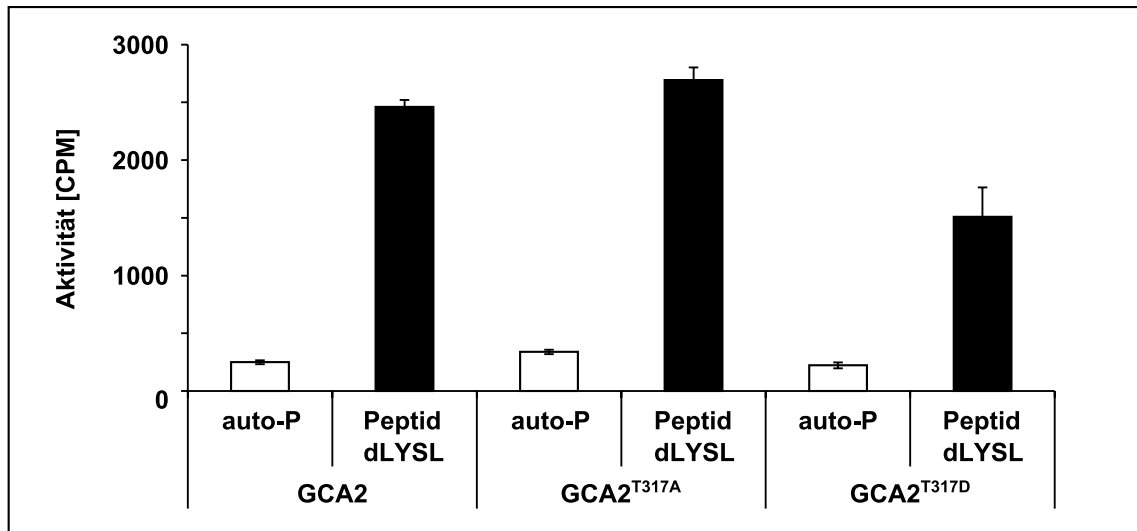


Abb. 3-36 Aktivität von GCA2^{T317}-Mutanten gegenüber einem ABF1-basierten Peptid
Phosphorylierung des Peptids ABF1-dLYSL durch GCA2, GCA2^{T317A} und GCA2^{T317D} mit 10 μM freiem Ca^{2+} im Reaktionsansatz. Als Maß für die Phosphorylierung dient die auf das Substrat übertragene Radioaktivität aus $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$. Alle GCA2-Varianten wurden in einer Konzentration von 1,4 μM eingesetzt

Neben der oben beschriebenen Phosphorylierung an der Position 317 wurde auch der Threoninrest an Position 213 als Phosphorylierungsstelle für OST1 identifiziert. Diese Position befindet sich sehr nah am Serinrest S²¹⁸, welcher als Autophosphorylierungsstelle von GCA2 identifiziert wurde, im *activation-loop* der Kinasedomäne. Es wurden sowohl Konstrukte zur rekombinanten Expression der T²¹³A-Version als auch der T²¹³D-Version generiert, jedoch war es nicht möglich, die T²¹³D-Version in ausreichender Menge als aktives, lösliches Protein in *E. coli* zu exprimieren. Daher konnte hier nur die GCA2^{T213A}-Variante getestet werden. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt Abb. 3-37. GCA2 zeigte in diesem Versuch eine Autophosphorylierung von 44 ± 8 CPM sowohl mit 3 μM Calcium, als auch ohne, während für GCA2^{T213A} keine Autophosphorylierung messbar war. Betrachtet man die Phosphorylierung von Casein durch GCA2 so zeigte sich eine Aktivität von 246 ± 1 CPM ohne sowie von 338 ± 92 CPM mit 3 μM Calcium, während die Aktivität von GCA2^{T213A} mit 22 ± 6 CPM bzw. 21 ± 1 CPM um das 11- bzw. 16-Fache niedriger ausfiel.

Ergebnisse

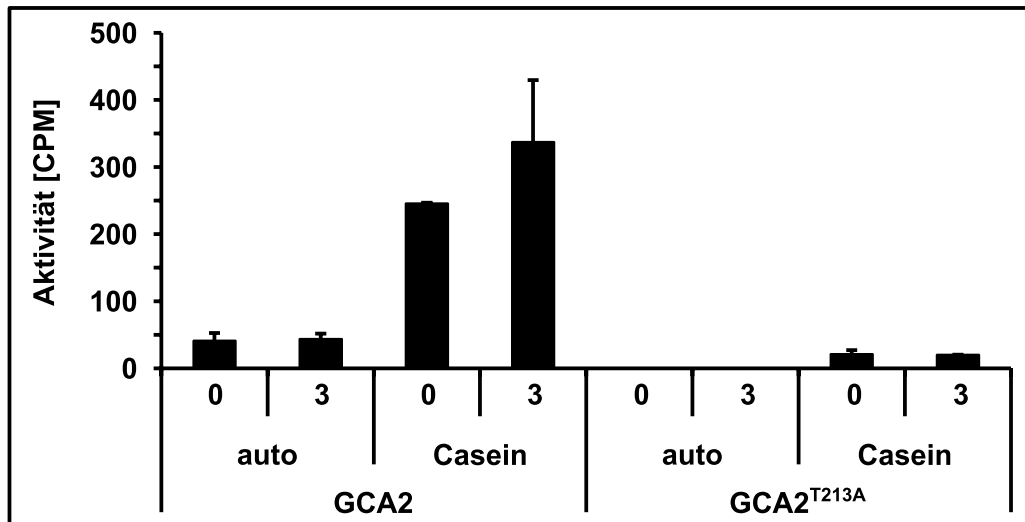


Abb. 3-37 Kinaseaktivität von GCA2^{T213A} im Vergleich zu GCA2-WT

Autophosphorylierung und Caseinphosphorylierung, gemessen als insgesamt auf Kinase und Substrat übertragene Radioaktivität, sowohl ohne als auch mit 3 μM freiem Calcium. Die Kinasekonzentration betrug jeweils 4 μM. n=3

4. Diskussion

Pflanzen sind als sessile Organismen im Laufe ihrer Entwicklung oftmals erheblichen Stresssituationen durch Umwelteinflüsse wie Trockenheit oder Pathogenbefall ausgesetzt. Dieser Stress beeinträchtigt die Biomasseproduktion sowie auch die Produktivität von Nutzpflanzen erheblich und führt so zu erheblichen ökonomischen Einbußen (Marris 2008). Das Phytohormon Abscisinsäure ist ein zentraler Regulator der Anpassung an abiotischen Stress und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Wasserhaushaltes bzw. der Trockenstressanpassung der Pflanzen (Finkelstein *et al.* 2002; Cutler *et al.* 2010). Steht der Pflanze nicht ausreichend Wasser im Boden zur Verfügung, so führt dies, vermittelt durch ein hydraulisches Signal (Christmann *et al.* 2007), zur Erhöhung des ABA-Gehaltes im Spross durch Freisetzung von ABA aus ABA-Glucoseester sowie durch Induktion der ABA-Biosynthese (Christmann *et al.* 2005; Nambara und Marion-Poll 2005). Die im Leigewebe synthetisierte ABA wird durch aktiven Transport über ABC-Transporter wie AtABCG25 (Export) (Kuromori *et al.* 2010) bzw. AtABCG40 (Import) (Kang *et al.* 2010) auf andere Zellen verteilt, wo sie zur Anpassung der Genexpression sowie zum Schließen der Spaltöffnungen führt, und so eine Anpassung des Wasserverbrauchs durch Reduktion der Transpiration bewirkt. Die Perzeption des ABA-Signals in der Zelle erfolgt durch RCAR/PYR/PYL-Proteine und Proteinphosphatasen des Typs 2C (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009b) wodurch eine komplexe Signalkaskade ausgelöst wird, an welcher neben den PP2Cs auch Proteinkinase aus der SnRK2-Familie (Mizoguchi *et al.* 2010) sowie aus der Familie der CPKs (Ludwig *et al.* 2004) sowie zahlreiche *second messenger*, insbesondere Wasserstoffperoxid und Calciumionen (Pei *et al.* 2000; Bright *et al.* 2006; Brault *et al.* 2004) beteiligt sind.

4.1. Ist GCA2 eine calciumabhängige Proteinkinase?

Wie bereits in Abschnitt 1.2 dargelegt wurde, stellt Calcium einen sehr wichtigen Botenstoff für die intrazelluläre Signalübertragung dar, welcher an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen beteiligt ist. Aufgrund der stringenten Kontrolle der cytosolischen Calciumkonzentration durch aktiven Export ist eine sehr schnelle und räumlich sowie zeitlich definierte Freisetzung von Calciumionen möglich, wodurch spezifische Calciumsensoren angesprochen werden können. Unter Anderem sind Calciumsignale auch an der Regulation der Stomata und der Genexpression unter Trockenstress beteiligt. Der ABA-unempfindliche Phänotyp der *gca2-1*-Mutante ist nach A. Korte (Korte 2009) auf eine Mutation in der 5'-UTR des für die calciumabhängige Proteinkinase CPK23 kodierenden Gens zurückzuführen, welche über einen bisher ungeklärten Mechanismus zu einer Erhöhung der Proteinmenge führt. Aufgrund dieses Befundes

Diskussion

wurde eine negative regulatorische Funktion von GCA2 bezüglich der ABA-Signalübertragung angenommen. Auf CPK23 aus dem Ökotypen *Landsberg erecta*, welcher den genetischen Hintergrund der *gca2*-Mutanten darstellt, wird im Folgenden als „GCA2“ Bezug genommen, während sich die Bezeichnung „CPK23“ auf das entsprechende Protein aus dem sehr häufig verwendeten Arabidopsis-Ökotypen *Columbia* bezieht. Ebenso wurde von Allen et. al. (Allen et al. 2001) gezeigt, dass in *gca2-1* sowohl die durch ABA als auch durch die Applikation von exogenem Calcium ausgelösten Erhöhungen der cytosolischen Calciumkonzentration gegenüber dem WT deutlich verändert sind und somit ein Zusammenhang zwischen GCA2 und der calciumvermittelten Signalübertragung besteht. Die Analyse der Aktivität von rekombinant in *E. coli* exprimiertem GCA2 in Abhängigkeit von der Menge an freiem Calcium hat ergeben, dass die Aktivität durch die Bindung von Calcium nur eine verhältnismäßig geringe Erhöhung auf das Zweifache der Grundaktivität zeigt. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung des orthologen Proteins aus dem Ökotypen *Columbia* durch Geiger et. al. (Geiger et al. 2010), welches ebenfalls nur eine zweifache Aktivierung durch die Bindung von Calcium erfährt. Dieser geringe Einfluss von Calcium auf die Kinaseaktivität könnte darauf zurückzuführen sein, dass in GCA2 eine Substitution der hoch konservierten Glutaminsäure auf der –Z-Position des ersten EF-Hand-Motivs durch Glutamin vorliegt, welche bewirkt, dass dieses nichtmehr in der Lage sein sollte, Calcium zu binden. Kürzlich wurde auch von Boudsocq et. al. eine vergleichende Untersuchung der Calciumregulation von insgesamt 14 Arabidopsis-CPKs aus den Untergruppen I-III durchgeführt (Boudsocq et al. 2012), wobei gezeigt wurde, dass CPK8, CPK10 und CPK32 ebenfalls, wie auch GCA2, nur eine schwache Calciumabhängigkeit mit einer Grundaktivität im Bereich von 60% bis 75% der Maximalen Aktivität aufweisen, während CPK7, CPK13, CPK25 und CPK30 überhaupt nicht durch Calcium beeinflusst werden. Die CPKs 8 und 32 weisen wie GCA2 jeweils eine mutierte erste EF-Hand auf, während bei CPK10 die dritte EF-Hand mutiert ist, allerdings kann kein direkter Zusammenhang zwischen der Funktionalität einzelner EF-Hände und der Calciumregulation hergestellt werden; so zeigte CPK19, welche wie CPK10 über eine mutierte erste EF-Hand verfügt, eine wesentlich deutlichere Calciumabhängigkeit als CPK10. Ebenso zeigte CPK30, welche über vier funktionale EF-Hand-Motive verfügt, keinerlei Regulation durch Calcium. Die Ergebnisse von Boudsocq et. al. bestätigen auch die Ergebnisse zum Verlauf der Kinaseaktivierung in Abhängigkeit der Calciumkonzentration für CPK3 und CPK21, welche bei der Untersuchung von GCA2 zum Vergleich herangezogen wurden.

Aufgrund des geringen Einflusses der Calciumbindung auf die Kinaseaktivität von GCA2 stellt sich die Frage, ob die Möglichkeit der Calciumbindung überhaupt für die Rolle von

Diskussion

GCA2 in der intrazellulären Signalübertragung relevant sei. Im Rahmen der Untersuchung der S-Typ-Ionenkanalaktivierung durch CPK21 und CPK23 (Geiger *et al.* 2010) wurde CPK23 daher auch eher zusammen mit OST1 dem calciumunabhängigen Teil des Signalwegs zur ABA-induzierten Aktivierung von SLAC1 zugeordnet welcher parallel zur calciumabhängigen Aktivierung des Kanals durch CPK21 verläuft.

Die beobachtete Erhöhung der Kinaseaktivität in Gegenwart von Calcium deutete allerdings darauf hin, dass GCA2, wenngleich seine Aktivität nicht stringent durch Calciumsignale reguliert zu sein scheint, durchaus in der Lage ist, Calciumionen zu binden. Dies wurde durch Versuche zur Messung der Calciumbindung an rekombinant exprimiertes GCA2 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) bestätigt (vgl. 3.2.3). Die Berechnung der Bindungsaffinitäten erfolgte hierbei unter Annahme eines Bindungsmodells mit drei sequentiell zu besetzenden Bindestellen und ergab Dissoziationskonstanten von 4,3 μM , 7,0 μM und 192 μM , welche insgesamt auf eine mittlere bis niedrige Affinität der Bindung hindeuten. Gilli *et al.* zeigten, dass ein synthetisches Calmodulin (Craig *et al.* 1987; Roberts *et al.* 1985), SynCaM, Calcium mit Dissoziationskonstanten von 0,54 μM , 0,82 μM , 2,3 μM und 10 μM bindet (Gilli *et al.* 1998), was einer mindestens 10-fach höheren Calciumaffinität als bei GCA2 entspricht. Allerdings wurde ebenfalls gezeigt, dass 5 mM Magnesium im Puffer die K_d -Werte der Calciumbindung an SynCaM zu 0,66 μM , 1,6 μM , 4,6 μM und 76,9 μM verschieben, was einer Verringerung der Affinität um das 10-Fache entspricht, während Magnesiumionen selbst lediglich mit K_d -Werten von 4,3 μM , 14,5 μM , 500 μM sowie 1000 μM an SynCaM binden und für den Einfluss von Magnesium auf die Calciumbindung ein nichtkompetitiver, allosterischer Mechanismus postuliert wurde. Für das menschliche calmodulinartige Protein CLSP (*Calmodulin-Like Skin Protein*) hingegen wurden Bindungsaffinitäten beschrieben (Babini *et al.* 2006) welche mit einem Bereich von 6,25 μM für die Bindestelle mit der höchsten Affinität bis 180 μM für die schwächste Bindestelle sehr stark den im Rahmen dieser Arbeit für GCA2 bestimmten Werten entsprechen und zeigen, dass selbst ohne signifikante Unterschiede in der Sequenz der Calciumbindestellen sehr große Unterschiede in der Calciumbindung auftreten können. Generell wird davon ausgegangen, dass die cytoplasmatische Calciumkonzentration, welche im Ruhezustand bei ca. 100 nM liegt bei der Übertragung von Calciumsignalen bis in den zweistelligen Mikromolaren Bereich ansteigen kann und dass deshalb die Calciumaffinität für signalübertragungsrelevante Calciumbindepoteine ebenfalls in diesen Bereich liegen muss (Yamniuk *et al.* 2008). Die beobachteten K_d -Werte von zwei der drei klassischen EF-Hände von GCA2 wären also mit 4,6 μM bzw. 7 μM noch in der Lage eine Rolle bei der Interpretation von zellulären Calciumsignalen zu erfüllen,

Diskussion

während die mit einer K_d von 192 μM sehr unempfindliche dritte Bindestelle hierfür nur eine untergeordnete Rolle spielen sollte.

Wie bereits erwähnt weist die regulatorische Domäne von GCA2 neben drei klassischen EF-Hand-Motiven (EF-Hand 2, 3 und 4) eine atypische erste EF-Hand auf. Vergleicht man die Aminosäuresequenz dieser EF-Hand mit dem typischen EF-Hand-Motiv (vgl. Abb. 4-1), so stellt man fest, dass die einzige Abweichung die Substitution der hoch konservierten Glutaminsäure an der Position 12 (-Z) der EF-Hand durch Glutamin ist. Die Carboxylgruppe der Seitenkette dieser Glutaminsäure ist nicht nur für die Koordination von zwei Bindestellen des Calciumions verantwortlich, sondern trägt auch über Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der EF-Hand zur Stabilisierung selbiger an sich bei (Gifford *et al.* 2007) (vgl. Abb. 4-2).

Position in EF-Hand	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koordination	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
Häufigste Aminosäure*	D	K	D	G	D	G	T	I	D	F	E	E
Häufigkeit [%]*	100	29	76	56	52	96	23	68	32	23	29	92
Ebenfalls häufig beobachtet (Frequenz $\geq 5\%$)*	-	A,Q T,V I,S E,R	N	K R N	S N	-	F,K E,Q Y,E R	V L	S,T E,N G Q	Y,A T,L E K	D,K A,P N	D
GCA2 EF1	D	T	N	R	S	G	T	I	T	Y	E	Q
GCA2 EF2	D	V	D	G	N	G	T	I	D	Y	Y	E
CPK21 EF1	D	T	D	K	S	G	T	I	T	Y	E	E
PfCDPK3 EF1**	D	E	D	G	K	G	Y	I	T	K	E	Q

Abb. 4-1 Vergleich der ersten EF-Hände von GCA2 mit dem klassischen EF-Hand-Motiv

Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der ersten und zweiten EF-Hand aus GCA2 mit der jeweils ersten EF-Hand aus AtCPK21 sowie PfCDPK3 mit dem klassischen EF-Hand-Motiv. Von der konservierten Sequenz (inkl. häufiger Variationen) abweichende Aminosäuren sind fett dargestellt. * Die Daten zur Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren sowie den häufig beobachteten Abweichungen in funktionalen EF-Händen wurden aus (Gifford *et al.* 2007) entnommen. ** Die Sequenz der ersten EF-Hand aus PfCDPK3 (*Plasmodium falciparum* CDPK3) stammt aus (Wernimont *et al.* 2011).

In wenigen Fällen befindet sich an dieser Position der EF-Hand ein Asparaginsäurerest, welcher allerdings aufgrund der kürzeren Seitenkette aus räumlichen Gründen nicht in der Lage ist, zwei Liganden für das Calciumion bereitzustellen, wodurch es zu einer Reduktion der Selektivität für Calcium gegenüber Magnesium (da Silva *et al.* 1995) kommen kann. Weiterhin kann bereits diese geringe Veränderung entscheidenden Einfluss auf die Konformation der Ausgangshelix der EF-Hand und somit auf die Interaktion des Bindeproteins mit seinen Zielproteinen haben (Ozawa *et al.* 2000; Grabarek 2005). Der Austausch zu einem Glutamin an dieser sehr wichtigen Position in der EF-Hand bewirkt den Verlust der Calciumbindefähigkeit und stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der EF-Hand (vgl. Abb. 4-2A).

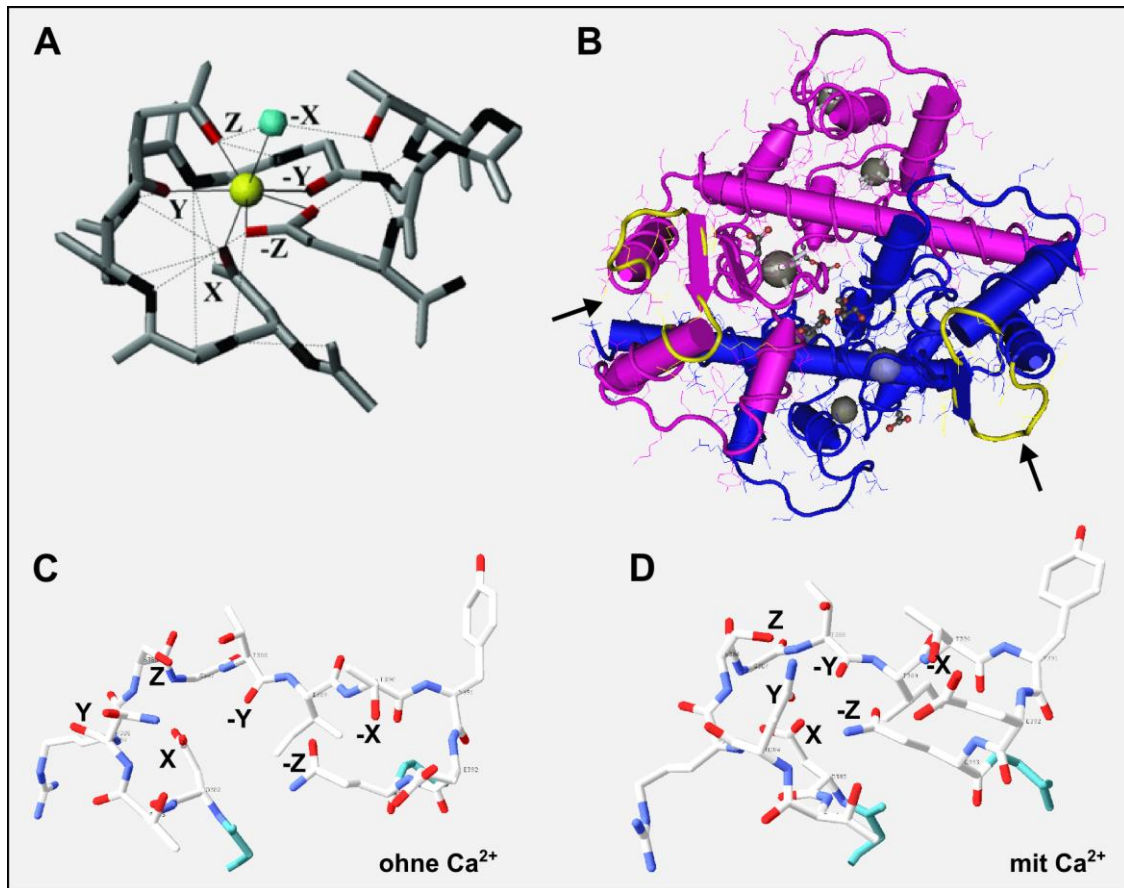


Abb. 4-2 Koordination von Calcium durch EF-Hände

(A) Pentagonal-bipyramidale Koordination eines Calciumions (gelb) durch eine klassische EF-Hand. Neben den Koordinationsbindungen sind auch die für die Stabilisierung der EF-Hand verantwortlichen Wasserstoffbrücken dargestellt. Während die Aminosäuren an den Positionen X, Y und Z jeweils eine Bindestelle des Ions über Sauerstoffatome ihrer Seitenketten besetzen, ist an der Position $-Y$ die Carbonylgruppe des Rückgrates hierfür verantwortlich, die Koordination durch $-X$ erfolgt über eine Wasserbrücke (türkis: Wassermolekül) während die hoch konservierte Glutaminsäure auf $-Z$ über die Sauerstoffatome der Carboxylgruppe zwei Koordinationsstellen besetzt. Entnommen aus (Gifford *et al.* 2007) Reproduced with permission, from Gifford *et al.* 2007, *The Biochemical Journal*, 405 (2), 199-221, ©The Biochemical Society. (B) Kristallstruktur der im Kristall dimer vorliegenden regulatorischen Domäne von PfCDPK3 (PDB: 3K21), welche ebenso wie GCA2 eine Substitution der Glutaminsäure an der $-Z$ -Position der ersten EF-Hand durch Glutamin aufweist. Die Bindschleife der ersten EF-Hand ist gelb hervorgehoben und durch Pfeile Markiert. Die grauen Kugeln symbolisieren die gebundenen Calciumionen, die erste EF-Hand ist nicht besetzt, nimmt aber eine einer calciumgebundenen EF-Hand entsprechende Konformation ein (Wernimont *et al.* 2011). (C,D) Vergleichende Darstellung der ersten EF-Hand von GCA2 sowohl ohne (C) als auch mit (D) Calcium. Es handelt sich um Ausschnitte von mit Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org>) erstellten Homologiemodellen. Als Vorlage für die Modellierung diente die Kristallstruktur von TgCDPK1 (Wernimont *et al.* 2010) in Abwesenheit von Calcium (PDB: 3KU2)(C) sowie in Anwesenheit von Calcium (PDB: 3HX4)(D). Weiß entspricht Kohlenstoff, Blau Stickstoff und Rot Sauerstoff, zusätzlich zu den 12 Aminosäuren der Koordinationsschleife enthalten die Abbildungen noch jeweils eine zusätzliche Aminosäure sowohl am N- als auch C-Terminalen Ende, welche zur besseren Erkennung türkis dargestellt sind.

Allerdings haben Wernimont *et al.* (Wernimont *et al.* 2011) anhand der Kristallstruktur von PfCDPK3, welche ebenfalls einen E- \rightarrow Q-Austausch an dieser Position aufweist, gezeigt, dass diese CDPK durch die Bindung von Calciumionen an die verbleibenden EF-Hände trotzdem eine stabile Konformation analog der calciumgebundenen Formen

Diskussion

anderer CDPKs einnehmen kann, indem die atypische EF-Hand durch die Seitenkette dieses Glutaminrestes, welche sich ins Zentrum der Bindestelle dreht sowie über die Koordination zweier Wassermoleküle (statt eines Ca^{2+} -Ions und eines Wassermoleküls) stabilisiert wird.

Da es sich bei der Mutation in der ersten EF-Hand von GCA2 aus chemischer Sicht lediglich um den Austausch einer Säure durch das korrespondierende Säureamid handelt, wäre evtl. auch ein Mechanismus denkbar, bei dem durch enzymatische Abspaltung der Amidgruppe unter bestimmten Umständen, beispielsweise als Reaktion auf einen externen Stimulus, aus der degenerierten EF-Hand eine funktionale Calciumbindestelle generiert werden könnte was zu einer Grundlegenden Veränderung des Verhaltens von GCA2 gegenüber Calciumsignalen führen könnte.

Interessanterweise führte der Austausch der Aminosäuren in den Positionen X und -Z in der ersten oder zweiten EF-Hand von GCA2 durch Alanin (X) und Lysin (-Z), welche die (potentielle) Calciumbindung durch diese verhindern sollten, zu einem vollständigen Verlust der Kinaseaktivität. Möglicherweise wird durch diese Mutationen die Stabilität der Struktur in der regulatorischen Domäne derart verändert, dass es nicht mehr möglich ist, die Interaktion der autoinhibitorischen J-Domäne mit der Kinasedomäne durch Bindung von Calcium an den verbleibenden EF-Händen zu lösen. Allerdings könnte dieser Effekt möglicherweise auch auf eine schlechtere Faltung dieser Versionen oder andere, besonders bei diesen Mutanten ins Gewicht fallende Effekte bei der Expression in *E. coli* zurückzuführen sein.

Trotz der lediglich moderaten Calciumaffinität und der hohen basalen Kinaseaktivität, ist GCA2 allerdings in der Lage, die in Folge der Perzeption eines ABA-Signals in Schließzellen entstehenden Oszillationen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration nachhaltig zu beeinflussen (Allen *et al.* 2001). In dieser Studie wurden Arabidopsis-Schließzellen definierten Calciumoszillationen ausgesetzt und deren Wirkung auf die Öffnung der Stomata analysiert, mit dem Ergebnis, dass sich mit einem bestimmten Oszillationsmuster ein anhaltendes Schließen der Stomata erzielen lässt und dass Abweichungen von diesem Muster diesen Effekt deutlich reduzieren. Ebenso wurden in dieser Studie die Calciumoszillationen, welche durch die Applikation von Calcium bzw. ABA in den Schließzellen ausgelöst werden, sowohl in der *gca2-1*-Mutante als auch dem Wildtyp analysiert, wobei festgestellt wurde, dass sich diese Calciumoszillationen in WT und *gca2-1* sehr deutlich in ihrer Frequenz unterscheiden (vgl. Abb. 4-3). Ebenso wurde gezeigt, dass in *gca2-1* ein anhaltender Stomataschluss erzielt werden kann, wenn man die Schließzellen WT-artigen Calciumoszillationen aussetzt, sowie dass es möglich ist, im WT ein zu *gca2-1* äquivalentes Verhalten zu erzielen, wenn man die Schließzellen

Diskussion

einem Oszillationsmuster aussetzt, welches dem in *gca2-1* beobachteten entspricht. Somit ist der ABA-unempfindliche Schließzellphänotyp von *gca2-1* wohl hauptsächlich auf die Verschiebung des ABA-induzierten Calciumsignals zurückzuführen, für dessen Entstehung GCA2 somit eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

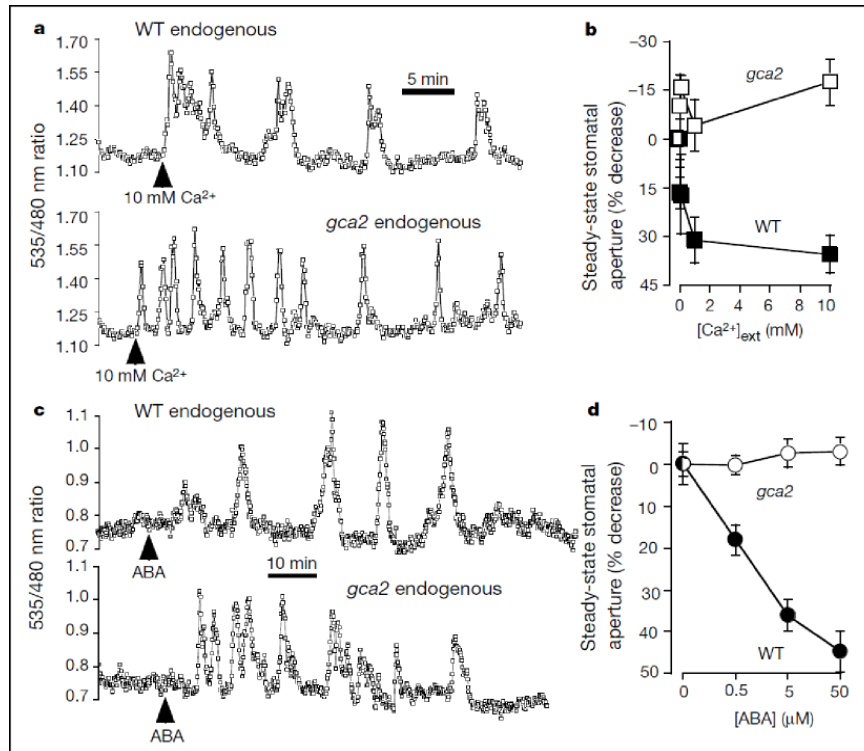


Abb. 4-3 Calciumoszillationen in *gca2-1* und *Landsberg erecta*

(a) Cytoplasmatische Calciumoszillationen ausgelöst durch 10mM externes Calcium in Schließzellen von *Ler* und *gca2-1* (b) Vergleich des Stomataschlusses von *gca2-1* und WT nach Applikation von externem Calcium (c) Durch 5µM ABA induzierte Calciumoszillationen in *gca2-1* und WT (d) Vergleich der Reaktion von *gca2-1*- und WT-Stomata bei ABA-Applikation (gesamte Abbildung entnommen aus Allen *et al.* 2001) Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, Allen *et al.*, „A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements“, copyright 2011 www.nature.com

4.2. Wird GCA2 durch Phosphorylierung reguliert?

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen und -phosphatasen nimmt eine zentrale Stellung in der Regulation zellulärer Prozesse ein, so liegen in menschlichen Zellen etwa 30 % aller Proteine in phosphorylierter Form vor (Cohen 2000) und das menschliche Genom enthält mehr als 500 Gene für Proteinkinasen, was einem Anteil von 1,7 % des gesamten Genoms entspricht (Manning 2002). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* finden sich 1019 für Proteinkinasen codierende Gene (Wang 2003) in Reis sind es sogar 1429 (Dardick *et al.* 2006). Dieser großen Anzahl an Kinasen stehen lediglich 112 (*Arabidopsis*) bzw. 132 (Reis) Proteinphosphatasen (Kerk 2002; Singh *et al.* 2010) gegenüber. Die Bedeutung von Proteinkinasen für die Signalübertragung in Pflanzenzellen zeigt sich sehr Eindrucksvoll am Beispiel der Familie

Diskussion

der RLKs (*Receptor-like kinases*, welche in *Arabidopsis* mindestens 610 Mitglieder zählt (Shiu 2001), welche an zahlreichen Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel der Brassinosteroid-Signalübertragung (Li und Chory 1997), der Kontrolle der Meristementwicklung (Clark *et al.* 1997) oder der Flagellinperzeption (Gómez-Gómez und Boller 2000) beteiligt sind (Shiu 2001). Kürzlich wurde mit GHR1 auch eine an der ABA-Signaltransduktion beteiligte RLK identifiziert (Hua *et al.* 2012). Im Fall von BRI1 führt die Bindung von Brassinosteroiden an die extrazelluläre Domäne der als homodimer vorliegenden RLK zu einer Aktivierung der intrazellulären Kinasedomäne, was zu einer verstärkten Phosphorylierung des C-Terminus von BRI1 führt, was wiederum die Phosphorylierung weiterer Positionen in BRI1 erlaubt und Bindungsstellen für nachgeschaltete Interaktionspartner generiert und somit die Signalübertragungskaskade initiiert (Wang *et al.* 2005). Ein weiteres Beispiel für die Signalübertragung durch Proteinphosphorylierung stellen die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalwege dar, welche an der Regulation zahlreicher Stressantworten wie Pathogenabwehr oder Kälteanpassung beteiligt sind. Hier wird das Signal durch die stufenweise Aktivierung (Phosphorylierung) nachgeschalteter Kinasen bis zu einem Zielprotein übertragen, nach der Erkennung eines Stimulus wird zuerst eine MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase) aktiviert, welche dann eine MAPKK (MAP-Kinase-Kinase) phosphoryliert, diese wiederum phosphoryliert eine MAPK, die dann schließlich ein Zielprotein phosphoryliert (Teige *et al.* 2004). Neben der Aktivierung durch eine übergeordnete Proteinkinase stellt die Autophosphorylierung eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Aktivität einer Proteinkinase dar. So wurde bei den meisten untersuchten CDPKs zumindest *in vitro*, eine calciumaktivierte und Mg-ATP-abhängige Autophosphorylierung beobachtet (Roberts und Harmon 1992). Um das Autophosphorylierungsverhalten von CDPKs genauer zu charakterisieren, wurde die *in vitro* stattfindende Autophosphorylierung von sieben *Arabidopsis*-CDPKs (CPK1, CPK4, CPK5, CPK10, CPK11, CPK16 und CPK28) sowie PfCDPK1 aus *Plasmodium falciparum* sowie zwei CRKs (*CDPK-related-kinases*) massenspektrometrisch untersucht (Hegeman *et al.* 2006). In dieser Auswahl an CDPKs wurden insgesamt fünf konservierte Autophosphorylierungsstellen in N-terminus, Kinasedomäne und der calmodulinartigen Domäne identifiziert, jedoch keine Stelle in der autoinhibitorischen Domäne. In GCA2 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit S³⁶² und S³⁶⁵ zwei im C-terminalen Bereich der autoinhibitorischen Domäne der CPK gelegene Autophosphorylierungsstellen identifiziert, wobei auffällig ist, dass GCA2 als einzige CDPK in *Arabidopsis thaliana* an der Position 362 über eine phosphorylierbare Aminosäure verfügt. Führt man ein Sequenzalignment aller 34 Mitglieder der AtCPK-Familie durch, so zeigt sich, dass diese Position hochgradig konserviert ist und bei 29 von 34 CPKs mit einem Isoleucin besetzt ist, die verbleibenden vier *Arabidopsis*-CPKs

Diskussion

tragen an dieser Position entweder ein Leucin oder Valin. Wie unter 3.5.1 dargelegt ist, führt der Verlust dieser Phosphorylierungsstelle zu keiner Änderung im autophosphorylierungsverhalten von GCA2 während die entsprechende Phosphomimikversion einen Verlust der calciumabhängigen Aktivierung der Autophosphorylierung zeigt. Die Betrachtung der Doppel-Phosphomimik-Version für S³⁶² und S³⁶⁵ zeigte ein ähnliches Verhalten, wobei jedoch die Autokinaseaktivität bereits ohne Calcium im Vergleich zum Wildtyp erhöht war, allerdings bei Erhöhung der Calciumkonzentration etwas hinter der Aktivität des Wildtyps zurück blieb. Die Substratphosphorylierung in Gegenwart von Calcium wurde allerdings gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht.

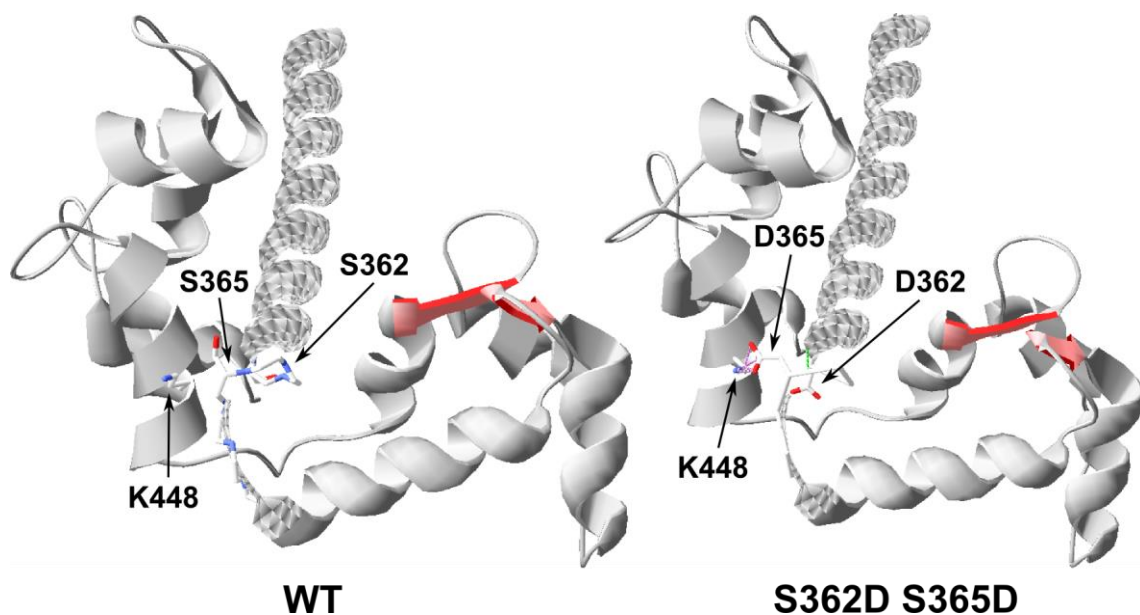


Abb. 4-4 Struktur der CLD von GCA2

Darstellung der Struktur der regulatorischen Domäne von GCA2 in calciumgebundenem Zustand anhand eines Homologiemodells. Als Vorlage zur Modellierung diente die Struktur der calciumgebundenen CLD von PfCDPK3 (PDB: 3K21) (Wernimont *et al.* 2011). In der ersten Abbildung sind die Serinreste an den Positionen 362 und 365 sowie der Lysinrest an Position 448 als Stabmodelle markiert. Die zweite Abbildung zeigt den Austausch von S365 durch einen Asparaginsäurerest („Phosphomimik“) wobei durch die angebrachte negative Ladung eine elektrostatische Wechselwirkung mit K448 und somit eine Stabilisierung der aktivierten Form der Kinase denkbar wäre.

Hieraus ließe sich der Schluss ziehen, dass die Phosphorylierung in der J-Domäne die „offene“ Konformation von GCA2 in Gegenwart von Calcium stabilisieren und somit zu einer Verbesserung des Zugangs zum Aktiven Zentrum führen könnte, bzw. eine Veränderung der calciumabhängigen Regulation, ähnlich wie bei CaMKII bewirken könnte. Untersuchungen zur Aktivierung von CaMKII (*Calmodulin-dependent protein kinase II*) aus Rattenhirn hatten ergeben, dass durch die Bindung von Ca²⁺/Calmodulin eine Autophosphorylierung in der autoinhibitorischen Domäne der Kinase ausgelöst wird, welche bewirkt, dass die Kinase auch nach der Entfernung des calciumgebundenen

Diskussion

Calmodulins nichtmehr vollständig inaktiviert wird, vielmehr führt die Entfernung des gebundenen Calmodulins zur Phosphorylierung weiterer Aminosäuren, wodurch die Fähigkeit zur Bindung von Calmodulin an CaMKII eingeschränkt wird. So behält die Kinase ihre calciumunabhängige Aktivität bei, kann allerdings nichtmehr durch Ca^{2+} /Calmodulin zur maximalen Aktivität stimuliert werden (Colbran 1992). Im Fall von GCA2 stellt sich allerdings aufgrund der moderaten Ausprägung dieses Effekts *in vitro* die Frage, ob dieses Verhalten *in vivo* überhaupt relevant sei, wobei es durchaus möglich ist, dass die Interaktionen mit endogenen Substraten oder die Spezifität für eine Zielsequenz hierdurch erheblich beeinflusst werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine vollständige Aktivierung von GCA2 nur in Kooperation mit weiteren (Auto-)Phosphorylierungsstellen gewährleistet ist. So wurde am Beispiel von zwei Autophosphorylierungsstellen in McCPK1 aus *Mesembryanthemum crystallinum* gezeigt, dass der Verlust von jeweils einer dieser Stellen weder Einfluss auf die Autophosphorylierung noch auf die Substratphosphorylierung hat, aber der Ausfall beider Phosphorylierungsstellen zu einem drastischen Einbruch der Substratphosphorylierung bei augenscheinlich unveränderter Autokinaseaktivität führt (Chehab *et al.* 2004). Allerdings muss eine Autophosphorylierung nicht zwangsläufig mit einer Aktivierung der Kinase einhergehen. Es wurde zwar beispielsweise für AhCDPK aus der Erdnuss gezeigt, dass die calciumabhängige Autophosphorylierung dieser Kinase Voraussetzung für die Phosphorylierung von Substraten ist (Chaudhuri *et al.* 1999). Es wurden allerdings auch CDPKs mit grundlegend anderem Autophosphorylierungsverhalten beschrieben, beispielsweise zwei calciumabhängige Proteinkinase aus der Goabohne (*Psophocarpus tetragonolobus*). Eine dieser Kinasen zeigt eine Reduktion der Transphosphorylierungsaktivität als Folge einer vollkommen calciumunabhängigen Autophosphorylierung, während die Substratphosphorylierung strikt durch Calcium reguliert wird (Saha und Singh 1995), während die zweite dieser CDPKs keinerlei Autophosphorylierung zeigt (Ganguly und Singh 1998).

Ein Vergleich der von Hegeman *et. al.* (Hegeman *et al.* 2006) in den untersuchten CDPKs identifizierten Autophosphorylierungsstellen mit den in GCA2 gefundenen Phosphorylierungen ergab, dass drei der in dieser Studie beschriebenen Autophosphorylierungsstellen auch in GCA2 identifiziert wurden. Hierbei handelt es sich um die Serine S⁷⁰, S²³³ und S⁴⁸⁰ in GCA2. S⁷⁰ wurde von Hegeman *et. al.* in AtCPK1 und AtCPK5 identifiziert, S²³³ in AtCPK16 und AtCPK28 während die zu S⁴⁸⁰ analoge Autophosphorylierung in AtCPK11 nachgewiesen worden war. Weiterhin wurde mit S²¹⁸ noch eine weitere Autophosphorylierungsstelle in der Kinasedomäne von GCA2 identifiziert, welche aufgrund ihrer Lage im *activation-loop* eine wichtige Rolle für die Aktivität von GCA2 spielen könnte, da die Aktivierung von Proteinkinase durch

Diskussion

Innerhalb der *Arabidopsis*-CPKs ist diese Position hoch konserviert, 23 von 34 CPKs tragen an dieser Position eine Asparaginsäure, neun AtCPKs eine Glutaminsäure aber lediglich CPK22 und CPK31 tragen an dieser Position ein Arginin bzw. Lysin. Abb. 4-5 zeigt einen Ausschnitt aus einem Sequenzalignment von OST1 und GCA2 sowie den CPKs 15, 21 und 23 im Bereich des Activation Loop. Bei dessen Betrachtung fällt auch auf, dass OST1 an der zu T213 in GCA2 homologen Position, welche in GCA2 durch OST1 *in vitro* phosphoryliert wird, mit einem Cystein eine polare, aber nicht phosphorylierbare Aminosäure trägt. Die Tatsache, dass ein Austausch von T213 durch Alanin zum Verlust der Kinaseaktivität von GCA2 führte, könnte ein Hinweis auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäure in der Regulation der Aktivität von GCA2 sein. Weiterhin fällt auf, dass OST1 auch an der zur Autophosphorylierungsstelle S218 in GCA2 homologen Position ein Serin (S164) trägt, welches allerdings im Fall von OST1 nicht als Autophosphorylierungsstelle identifiziert wurde. Dies gilt auch für das in GCA2 Autophosphorylierungsstelle identifizierte Serin 233 (T179 in OST1). Da sich dieser Serinrest allerdings in unmittelbarer Nachbarschaft zu D229 im Activation Loop befindet, wäre es denkbar, dass es sich hierbei eventuell um das oben erwähnte funktionelle Äquivalent zu S175 aus OST1 handeln könnte (vgl. Abb. 4-6).

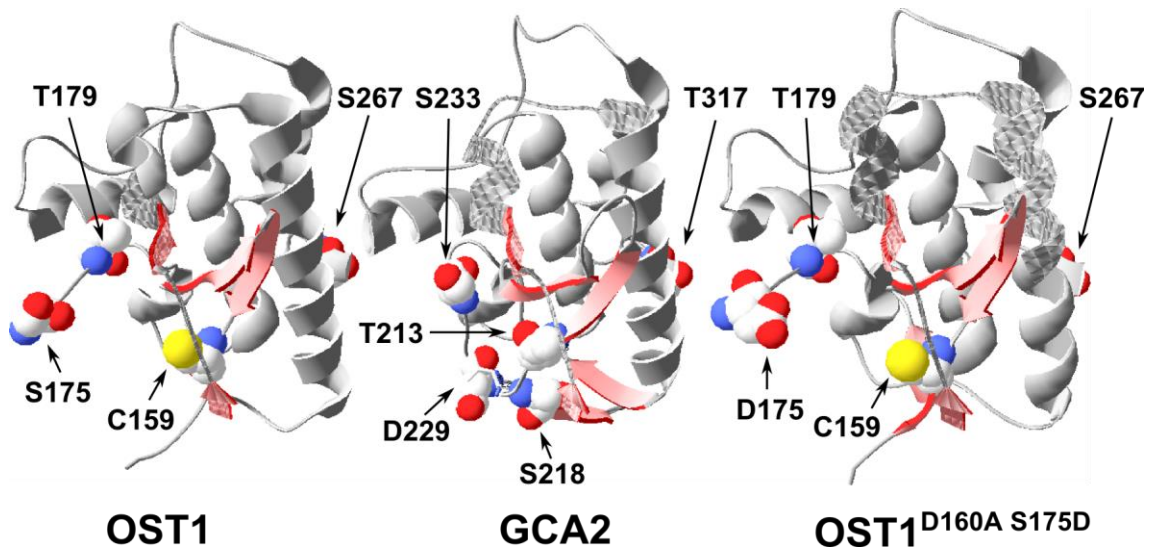


Abb. 4-6 Vergleich der Kinasedomänen von OST1 und GCA2

Dargestellt sind Ausschnitte aus der Kinasedomäne von OST1 (PDB: 3UC4 Ng *et al.* 2011), GCA2 (Homologiemodell basierend auf PDB 3HX4) und einer kinaseinaktiven (D160A) Phosphomimikvariante (S175D) von OST1 (PDB: 3ZUU Yunta *et al.* 2011). Für GCA2 umfasst dieser Ausschnitt die Aminosäuren 148-318, bei OST1 die Aminosäuren 95-268.

Die Vermutung einer direkten Regulation der Aktivität von GCA2 durch PP2Cs wird auch durch die in Yeast-Two-Hybrid-Versuchen gefundene Interaktion der Kinasedomäne von GCA2 mit PP2CA untermauert (Stefan Fuchs, unveröffentlicht). Weiterhin wurden einige Kandidaten für mögliche Autophosphorylierungsstellen im variablen N-Terminus sowie in der calmodulinartigen Domäne (CLD) von GCA2 identifiziert, wobei die Phosphorylierung

Diskussion

im N-Terminus ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre, da diesem Bereich eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von GCA2 *in vivo* zukommen könnte. So wurde für die CDPKs NtCDPK2 sowie NtCDPK3 aus Tabak gezeigt, dass für die Aktivierung der Kinasen *in vivo* eine Autophosphorylierung des N-Terminus in Kombination mit einer ebenfalls im N-Terminus lokalisierten Phosphorylierung durch eine übergeordnete Proteinkinase erforderlich ist (Romeis *et al.* 2001; Witte *et al.* 2010a). Für GCA2 konnte sowohl gezeigt werden, dass zumindest *in vitro* eine calciumunabhängige, aber durch PP2C/RCAR/ABA kontrollierte Phosphorylierung durch OST1 stattfindet, als auch dass autophosphoryliertes GCA2 in der Lage ist, die Kinaseaktivität von OST1 einzuschränken, ohne dass eine Phosphorylierung von OST1 durch GCA2 nachweisbar war. Bei der Untersuchung der OST1-vermittelten Phosphorylierung in GCA2 stellte sich heraus, dass eine der Phosphorylierungsstellen an Position 213 in direkter Nachbarschaft zur Autophosphorylierungsstelle S²¹⁸ im *Activation-Loop* der Kinasedomäne liegt und dass ein Verlust dieser Phosphorylierungsstelle durch Mutation zu Alanin die Autophosphorylierung verhindert, während die Transphosphorylierungsaktivität von GCA2 drastisch reduziert wird. Der Verlust der zweiten OST1-Phosphorylierungsstelle in der Kinasedomäne von GCA2 an Position 317 hingegen hatte keine signifikante Auswirkung auf die Aktivität von GCA2, allerdings führte die entsprechende Phosphomimikmutation zu einer deutlichen Reduktion der Kinaseaktivität. Insgesamt lässt die wechselseitige Beeinflussung von GCA2 und OST1 einen in beide Richtungen wirksamen Feedback-Mechanismus zwischen diesen beiden Proteinkinasen vermuten, wobei hier durch die calciumabhängige Komponente der Aktivität von GCA2 eine Integration von Calciumsignalen in den OST1-Signalweg möglich wäre. Da sowohl OST1 als auch GCA2, sowie auch CPK3, CPK6 und CPK21 parallel an der Aktivierung von SLAC1 sowie auch seinem Homolog SLAH3 im ABA-induzierten Stomataschluss beteiligt sind (Mori *et al.* 2006; LEE *et al.* 2009; Geiger *et al.* 2009; Geiger *et al.* 2010; Geiger *et al.* 2011), stellt sich die Frage, in welcher Beziehung diese einzelnen Proteinkinasen zueinander stehen. Während die CPKs 3 und 21 eine strikte Calciumabhängigkeit ihrer Aktivität zeigen, verfügen sowohl CPK6 als auch GCA2/CPK23 über eine calciumunabhängige Grundaktivität in der Größenordnung von 50% ihrer maximalen Aktivität (Scherzer *et al.* 2012 sowie diese Arbeit). OST1 bewirkt neben der Aktivierung der Anionenkanäle ebenfalls eine Aktivierung der NADPH-Oxidaseuntereinheit AtrbohF (Sirichandra *et al.* 2009) wodurch Wasserstoffperoxid gebildet wird, welches wiederum in Verbindung mit der Regulation der PP2Cs sowie der Freisetzung von Calcium steht. In der *ost1*-Mutante lassen sich normale Reaktionen auf exogenes Wasserstoffperoxid und Calcium beobachten (Mustilli *et al.* 2002), allerdings ist der ABA-abhängige

Diskussion

Stomataschluss aufgrund des Fehlens von OST1 beeinträchtigt. Somit ist OST1 essentiell für die Aktivierung des calciumabhängigen Teils dieser Signaltransduktionskette. Es wäre somit als nicht unwahrscheinlich anzusehen, dass eventuell nach der Aktivierung von OST1 sowie der calciumunabhängigen Grundaktivität von CPK6 und GCA2/CPK23 durch ABA und der daraus resultierenden Aktivierung der NADPH-Oxidaseaktivität und Calciumfreisetzung eine direkte Abschwächung dieses positiven Feedbacks von Seiten der CPKs erfolgen könnte. Somit wäre eine gezielte Steuerung des Aktivierungsverlaufs dieser Kinasen möglich. Auch im Bezug auf die Aktivierung der S-Typ-Ionenkanäle wäre eine Feineinstellung der Erzielten Aktivierung durch Wechselwirkungen der beteiligten Proteinkinasen untereinander sowie durch Wechselwirkungen verschiedener kinasespezifischer Phosphorylierungsstellen am Ionenkanal selbst denkbar, wobei an diesem Punkt auch noch ein Einfluss der an der ABA-Antwort beteiligten RLK GHR1 postuliert wurde, welche ebenfalls in der Lage ist, SLAC1 zu phosphorylieren und analog zu den oben angeführten Kinasen durch die PP2C ABI2 negativ reguliert wird.

4.3. Welche Rolle spielt die Kinaseaktivität von GCA2?

Aufgrund der zentralen Bedeutung von Proteinphosphorylierungen für zelluläre Funktionen (vgl. 4.2) steht einer einzelnen Proteinkinase eine sehr große Auswahl potentielle Substrate zur Verfügung. Im Bereich der ABA-regulierten Stressantworten zählen hierzu unter anderem Transkriptionsfaktoren der bZIP- und Homeodomain-Familie wie beispielsweise die AREBs/ABFs und ABI5, (Finkelstein *et al.* 2005; Sirichandra *et al.* 2010; Yoshida *et al.* 2010) oder HB6 (Finkelstein *et al.* 2005), sowie verschiedene Ionenkanäle, beispielsweise SLAC1 (Scherzer *et al.* 2012) oder KAT1 (Li *et al.* 1998) aber auch die an der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligte NADPH-Oxidase AtRbohF (Sirichandra *et al.* 2009), für die allesamt ein regulatorischer Einfluss von Phosphorylierungen gezeigt werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GCA2 *in vitro* in der Lage ist, den bZIP-Transkriptionsfaktor ABF1, die PP2Cs ABI1 und ABI2 sowie die RCAR-Proteine RCAR9 und RCAR11 zu phosphorylieren. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungsstellen in ABF1, S^{27/28} und T¹³⁵ entsprechen allerdings den bereits anhand von AREB1/ABF2 identifizierten Phosphorylierungsstellen S²⁶ und T¹³⁵ entsprechen (Furihata *et al.* 2006). Für ABF2 wurde gezeigt, dass diese Positionen, zusammen mit S⁸⁶, S⁹⁴ und S⁴¹³, durch SnRK2s phosphoryliert werden und der regulatorische Einfluss dieser Modifikationen wurde durch transiente Expression entsprechender Phosphomimik-Mutanten in *Arabidopsis*-Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen untersucht. Es wurde gezeigt, dass der Verlust einzelner Phosphorylierungsstellen in allen Fällen außer bei S⁴¹³ zu

Diskussion

einer Reduktion der ABA-induzierten Transaktivierung eines unter der Kontrolle des *RD29B*-Promotors stehenden Reporters führt, während die Substitution eines oder mehrerer dieser Serin- bzw. Threoninreste durch Asparaginsäure, welche den phosphorylierten Zustand simulieren soll, bereits ohne ABA zu einer starken Erhöhung der ABF2-Aktivität, führte. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führte der entsprechende Austausch des Serins an Position 28 in ABF1 lediglich zu einer leichten Reduktion der pRD29b-Transaktivierung für die S²⁸D-Variante, während der Verlust dieser Phosphorylierungsstelle keine signifikante Wirkung auf die ABF1-Aktivität in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten des Ökotypen *Landsberg erecta* hatte. Es wäre allerdings möglich, dass diese Diskrepanz durch das sehr verschiedene Pflanzenmaterial hervorgerufen wird. Trotzdem besteht die Möglichkeit eines regulatorischen Einflusses von GCA2 auf die Aktivität von ABF1 oder anderen Mitgliedern der AREB/ABF-Familie, obwohl hierfür eine Veränderung der Lokalisation des GCA2-Proteins von der Plasmamembran, an die es über eine N-terminale Myristoylierung gebunden ist (Korte 2009) in den Zellkern erforderlich wäre. Eine derartige stimulusbedingte Lokalisationsänderung wurde beispielsweise für McCPK1, eine calciumabhängige Proteinkinase aus *Mesembryanthemum crystallinum* beschrieben, welche ebenfalls über eine N-terminale Myristoylierung an die Plasmamembran gebunden ist, aber unter Salzstress oder bei niedriger Luftfeuchtigkeit ihre subzelluläre Verteilung ändert und unter diesen Bedingungen dann auch im Zellkern, an Actinfilamenten und dem endoplasmatischen Retikulum zu finden ist (Chehab *et al.* 2004). Bei den AREBs/ABFs handelt es sich um bZIP-Transkriptionsfaktoren mit zentraler Bedeutung für die ABA-abhängige Genregulation. Sie wurden ursprünglich in *Yeast-one-hybrid*-Studien aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bindung an ABRE-(ABA-responsive element)-Sequenzen identifiziert. (Uno *et al.* 2000; Choi *et al.* 2000) Bei ABREs handelt es sich um regulatorische *cis*-Elemente, welche in den Promotoren einer Vielzahl von ABA-regulierten Genen zu finden sind und die in mehrfacher Ausführung oder in Verbindung mit zusätzlichen Kopplungselementen für die Aktivierung dieser Promotoren durch ABA verantwortlich sind (Leung und Giraudat 1998; Bonetta und McCourt 1998; Grill und Himmelbach 1998). Bei den fünf in *Arabidopsis* als AREBs/ABFs identifizierten bZIP-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Mitglieder der bZIP-Untergruppe A, in der sich neben den AREBs/ABFs noch neun weitere Proteine mit homologer Domänenarchitektur finden (Fujita *et al.* 2012). Unter diesen Homologen finden sich unter anderem die vier Mitglieder der ABI5/AtDPBF-Familie (DPBF = *Arabidopsis Dc3 promoter-binding factors*), welche vor allem in Samen exprimiert werden und eine wichtige Rolle bei der Samenreife spielen (Finkelstein und Lynch 2000; Bensmihen 2002, 2005; Lopez-Molina *et al.* 2001; Kang *et al.* 2002; Finkelstein *et al.* 2005; Kim 2006). Die Expression

Diskussion

der AREBs/ABFs hingegen erfolgt überwiegend während des vegetativen Wachstums und wird durch abiotische Stressbedingungen wie Wassermangel, Salzstress und Kälte sowie durch ABA induziert (Choi *et al.* 2000; Uno *et al.* 2000; Kang *et al.* 2002; Fujita 2005), welche zusätzlich auch noch für die vollständige Aktivierung dieser Proteine erforderlich ist (Uno *et al.* 2000). Von Uno *et al.* wurde ebenfalls gezeigt, dass eine durch ABA aktivierte Proteinkinase aus *Arabidopsis*-Zellextrakten mit einem Molekulargewicht von 42 kD in der Lage ist, den N-Terminus von ABF2 und ABF4 zu phosphorylieren, weshalb eine Aktivierung dieser ABFs durch diese Phosphorylierung postuliert wurde. Im Rahmen weiterer Untersuchungen (Furihata *et al.* 2006) wurde am Beispiel von AREB1/ABF2 gezeigt, dass diese Phosphorylierung durch Proteinkinasen der SnRK2-Familie vermittelt wird und dass diese Phosphorylierungen einen regulatorischen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von AREB1/ABF2 in *Arabidopsis*-Protoplasten hat. So wurde die Reporteraktivierung durch den Austausch der Serin- bzw. Threoninreste dieser Phosphorylierungsstellen durch Alanin unterdrückt, wobei sich additive Effekte beim Verlust mehrerer Phosphorylierungsstellen zeigten, während der Austausch der selben Aminosäuren durch Asparaginsäure, welche den phosphorylierten Zustand des Proteins simulieren soll, eine deutliche Verstärkung der Reporteraktivierung, selbst in Abwesenheit von ABA, zur Folge hatte. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Überexpression einer „phosphorylierten“ aktiven Form von AREB1/ABF2, in welcher alle relevanten Serin- und Threoninreste durch Asparaginsäure ersetzt wurden, zu einer erhöhten Trockenstresstoleranz im Vergleich zu Pflanzen führt, die nur die Wildtypversion von AREB1/ABF2 überexprimieren. Von den zehn Mitgliedern der SnRK2-Familie in *Arabidopsis* werden neun durch osmotischen Stress aktiviert, zwei zeigen zusätzlich eine schwache Aktivierung durch exogene ABA (SnRK2.7 und 2.8) aber nur die drei Mitglieder der SnRK2-Untergruppe III (SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6) zeigen eine starke Aktivierung der Kinaseaktivität sowohl nach ABA-Applikation als auch osmotischen Stress (Boudsocq *et al.* 2004), Triple-Mutanten, in denen diese drei SnRKs ausgeschaltet sind, zeigen einen fast vollständig ABA-unempfindlichen Phänotyp welcher mit starker Stressanfälligkeit und sehr stark reduzierter Expression stressinduzierter Gene einhergeht (Fujii und Zhu 2009; Fujita *et al.* 2009). Interessanterweise ist in der *snrk2.2/2.3/2.6*-Mutante auch die Expression von vielen Transkriptionsfaktoren drastisch reduziert, darunter auch AREB1/ABF2 und ABF3 welche direkt durch diese Proteinkinasen phosphoryliert werden (Fujita *et al.* 2009). Obwohl die SnRK2s zentrale Regulatoren der ABF-vermittelten Genexpression sind, spielen auch andere Proteinkinasen eine Rolle in diesem Signalweg. So wurde für AREB2/ABF4 zusätzlich zur Interaktion mit den SnRK2s auch eine Interaktion mit CPK32 sowie seine Phosphorylierung durch diese Kinase gezeigt und ein positiver

Diskussion

regulatorischer Effekt von CPK32 auf die Aktivität von AREB2/ABF4 postuliert (Choi *et al.* 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass CPK4 und CPK11 sowohl mit ABF1 als auch ABF4/AREB2 interagieren und in der Lage sind diese zu phosphorylieren und als positive Regulatoren der ABA-Signalübertragung wirken (Zhu *et al.* 2007). Obwohl mit dem SnRK2-AREB/ABF-Signalweg bereits ein zentraler Pfad des ABA-Signalübertragungsnetzwerks rekonstruiert wurde, bestehen gerade hier aufgrund der Vielzahl der involvierten Faktoren und Interaktionsmöglichkeiten noch einige Unklarheiten. So wurde beispielsweise eine gegenseitige Beeinflussung verschiedener bZIP-Transkriptionsfaktoren, wie ABF1, ABF3 und ABI5 postuliert, deren Wirkung vom Entwicklungsstadium der Pflanze abhängig ist (Zhu *et al.* 2007).

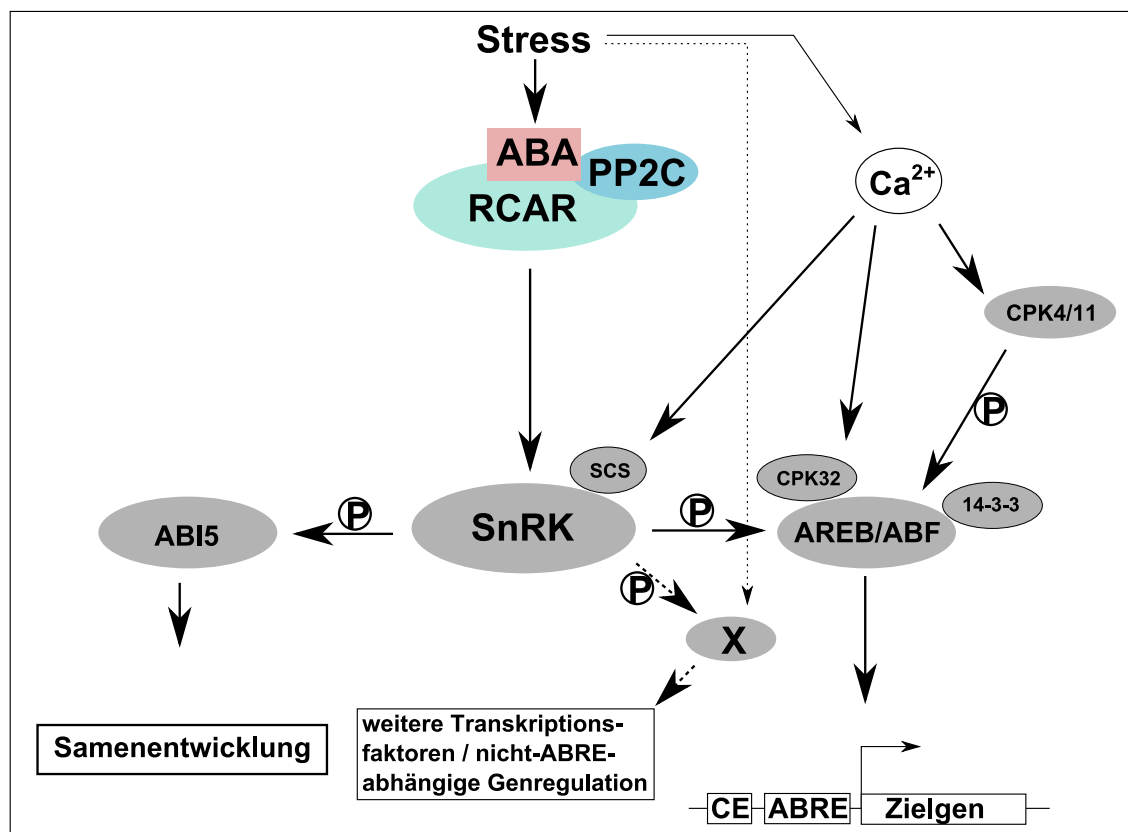


Abb. 4-7 Schematische Darstellung der ABA-abhängigen Genregulation

In diesem stark vereinfachten Schema der ABA-abhängigen Genregulation nehmen die SnRK2s eine zentrale Rolle ein, da sie durch Phosphorylierung der AREBs/ABFs die Transkription von ABA-responsiven Genen aktivieren. Neben den SnRKs nehmen allerdings auch weitere Faktoren wie beispielsweise Calcium direkten oder indirekten (SCS1-vermittelten) Einfluss auf die Aktivität der AREBs/ABFs. Vereinfachtes Schema in Anlehnung an (Fujita *et al.* 2012)

Die RCAR-Proteine sind ABA-(Co)Rezeptoren, welche zusammen mit den PP2Cs der Untergruppe A, den zentralen Ausgangspunkt für den ABA-vermittelten Stomataschluss und die Aktivierung ABA-induzierter Genexpression darstellen. Diese PP2Cs, deren prominenteste Vertreter ABI1 und ABI2 sind, unterdrücken durch ihre Aktivität die ABA-Antwort, bis sie durch ein ABA-Signal im RCAR/PP2C/ABA-Rezeptorkomplex gebunden

Diskussion

und dadurch inaktiviert werden (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009b). Da GCA2 in der Lage ist, sowohl verschiedene RCARs als auch die PP2Cs ABI1 und ABI2 zu phosphorylieren, könnte es auf diese Weise Einfluss auf die ABA-Reaktion der Pflanze nehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aminosäuren S101 und T200 in ABI2 als die Positionen identifiziert, an denen ABI2 durch GCA2 phosphoryliert wird. Während die Aminosäuresequenz um S101 mit -RTES- zu einem CDPK-Phosphorylierungsmotiv (Roberts und Harmon 1992) passt, so lässt sich für T200 keine derartige Übereinstimmung feststellen. Diese beiden Phosphorylierungsstellen sind zwischen ABI1 und ABI2 konserviert, nicht jedoch in den restlichen Mitgliedern der PP2C-Untergruppe A. Neben diesen beiden hier gefundenen Phosphorylierungsstellen existieren sowohl in ABI1 als auch ABI2 noch weitere potentielle CDPK-Phosphorylierungsmotive. So wurden drei dieser Kandidaten, namentlich T16, S101 und T261 im Rahmen einer Studie von Sun *et al.* (Sun *et al.* 2011) anhand von ABI2 auf mögliche Rollen in der Regulation der ABA-Antwort hin untersucht. Hierzu wurden sowohl Phosphomimikmutanten als auch Deletionsmutanten, in denen jeweils die vollständigen R-X-X-S/T-Motive entfernt wurden, getestet. Es wurde anhand von transgenen *Arabidopsis*-Linien gezeigt, dass der durch die Überexpression der Phosphomimikmutanten bzw. nicht mehr phosphorylierbaren Versionen von ABI2 der selbe ABA-unempfindliche Keimungs- bzw. Keimlingswachstumsphänotyp erreicht wird, wie es bei der Überexpression des unmodifizierten Proteins der Fall ist. Daher wurde postuliert, dass eine eventuelle Phosphorylierung dieser Aminosäuren keine Rolle für die Regulation der ABA-Antwort spielt. Allerdings wurde auch beobachtet, dass Deletionsmutanten der Aminosäuren 258-261 im *Yeast-two-hybrid*-System keine bzw. nur noch eine reduzierte Interaktion mit RCAR8 und RCAR1 sowie SnRK2.6 zeigten. Die Überexpression dieser ABI2-Version in stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen verursachte, im Gegensatz zu Wildtyp-ABI2, keinen ABA-insensitiven Phänotyp. Es wurde postuliert, dass dieser Effekt auf die Zerstörung einer potentiellen ATP/GTP-Bindestelle (Schweighofer *et al.* 2004) durch diese Deletion zurückzuführen sei. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein Effekt der identifizierten Phosphorylierungen auf die Aktivität von ABI2 *in vitro* bzw. auf deren Regulation durch RCAR-Proteine und ABA festgestellt werden.

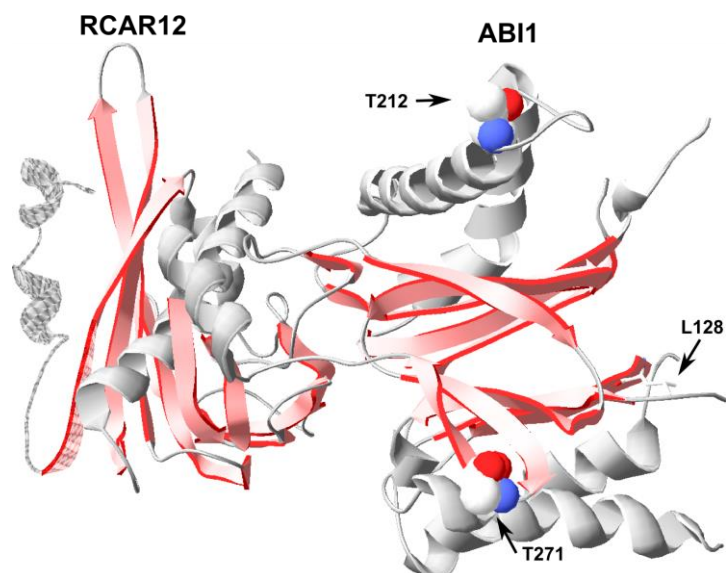


Abb. 4-8 Struktur des ABA-Rezeptorkomplexes aus RCAR12 und ABI1

Kristallstruktur des ABA-gebundenen Komplexes aus RCAR12 und ABI1. Die markierten Aminosäuren in der Struktur von ABI1 sind T212, welches homolog zu T200 in ABI2 ist sowie T271, das Homolog zu T261 in ABI2 sowie L128, welches die erste Aminosäure am N-Terminus von ABI1 in dieser Struktur darstellt. PDB: 3KDJ (Yin *et al.* 2009)

Die Position der Phosphorylierungsstelle T200 ist in Abb. 4-8 anhand der Kristallstruktur des Komplexes aus RCAR12, ABI1 und ABA dargestellt. Das zu T200 homologe T212 liegt nicht im Bereich der Interaktionsfläche zwischen RCAR und PP2C. Die Position von S101 kann hier leider nicht veranschaulicht werden, da in sämtlichen publizierten Kristallstrukturen N-terminal verkürzte Varianten der PP2Cs verwendet wurden. In dieser Abbildung ist auch T271, welches homolog zu T261 in ABI2 ist markiert um die Position der in (Sun *et al.* 2011) beschriebenen Deletion an dieser Stelle zu veranschaulichen. Auch wenn S101 und T200 auf der dem RCAR-abgewandten Seite der PP2C liegen, so besteht dennoch die Möglichkeit, dass durch eine Phosphorylierung an diesen Positionen eventuelle Interaktionen mit weiteren Proteinen beeinflusst werden könnten. Allerdings lässt sich keine sichere Aussage über die Lage des N-Terminus der PP2C bezüglich des interagierenden RCAR-Proteins treffen, da für die bisher veröffentlichten Kristallstrukturanalysen immer mindestens die ersten 100 Aminosäuren der PP2Cs entfernt wurden, um eine Kristallisation zu ermöglichen. Jedenfalls zeigten sich *in vitro* keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ABA-abhängigen Inhibierung der Phosphataseaktivität der Phosphomimikmutanten oder der nichtmehr phosphorylierbaren Versionen von ABI2 durch RCAR1 im Vergleich zum ABI2-WT.

Weiterhin besteht noch die Möglichkeit einer Beeinflussung der ABA-Sensitivität durch Phosphorylierung von RCAR-Proteinen, wie sie bereits 2009 von A. Korte postuliert worden war (Korte 2009). Es konnte damals mittels Yeast-two-hybrid-Studien eine Interaktion von GCA2 und RCAR1 gezeigt werden (Abb. 4-9 A). Weiterhin war bei der

Diskussion

Überexpression von RCAR1 in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten zusammen mit dem ABA-induzierbaren *pRD29b::Luciferase*-Reporter eine Hyperstimulation der Reporteraktivität zu beobachten, welche durch Coexpression einer verkürzten, konstitutiv aktiven Form von GCA2 (GCA2-VK) verhindert werden konnte, nicht jedoch durch Coexpression von kinaseinaktivem GCA2 (GCA2-TK) (Abb. 4-9 B). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass Phosphomimik-Mutationen an einzelnen, anhand von CDPK-Konsensusmotiven ausgewählten Positionen von RCAR1 ebenfalls in der Lage waren, die RCAR1-vermittelte Hyperstimulation der Expression ABA-induzierter Reporterkonstrukte in *Arabidopsis*-Protoplasten zu unterbinden (vgl. Abb. 4-9 C).

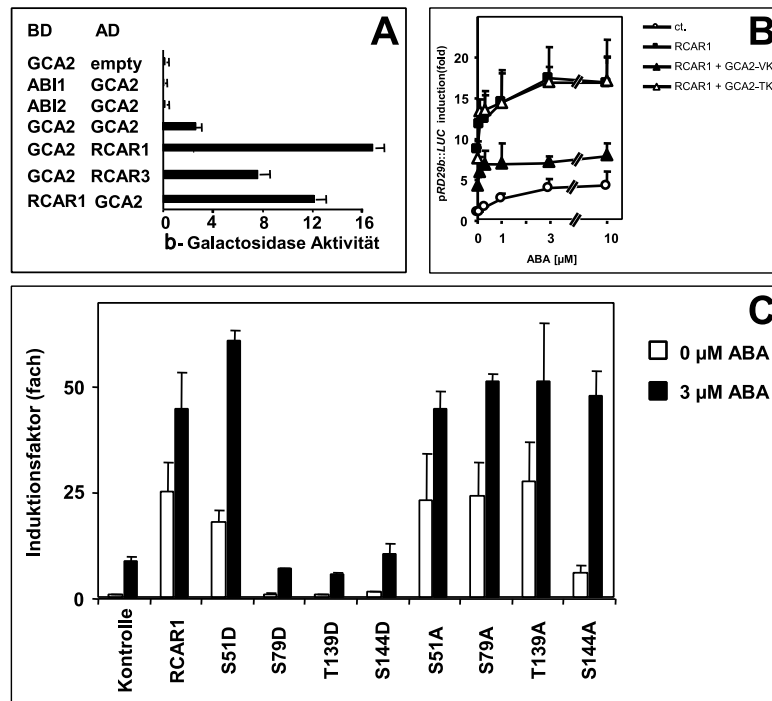


Abb. 4-9 Interaktion von GCA2 und RCAR1 (Daten von A. Korte)

(A) In Yeast-two-hybrid-Studien konnte eine Interaktion von GCA2 mit den RCAR-Proteinen RCAR1 und RCAR3 gezeigt werden. (B) Einfluss der Coexpression von GCA2 auf die Induktion der ABA-Antwort in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten durch RCAR1. Die Expression von RCAR1 führt zu einer Verstärkung der Aktivierung des ABA-induzierbaren *pRD29b::Luciferase*-Reporters im Vergleich zur Kontrolle ohne RCAR1. Die zusätzliche Expression der konstitutiv aktiven verkürzten Version von GCA2 (GCA2-VK) führt zu einer deutlichen Reduktion dieses Effekts, während eine inaktive Version von GCA2 (GCA2-TK) keinerlei Einfluss zeigt. (C) Der Vergleich der ABA-abhängigen Reporteraktivierung (*pRD29b::Luciferase*) in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten durch RCAR1 und verschiedene Phosphomimik-Mutanten von RCAR1 zeigt, dass der Austausch von S79, T139 oder S144 durch Asparaginsäure zu einer Inaktivierung von RCAR1 führt, während die entsprechenden Alanin-Substitutionen keinen Einfluss auf dessen Aktivität haben. Alle diese Mutationen basieren auf der Untersuchung der Proteinsequenz von RCAR1 auf potentielle CDPK-Erkennungssequenzen anhand veröffentlichter Phosphorylierungsmotive. Alle Teilabbildungen wurden stammen aus der Dissertation von A. Korte (Korte 2009).

Aufgrund der Befunde von A. Korte schien eine regulierende Phosphorylierung von RCAR1 durch GCA2 wahrscheinlich. Es konnte nun allerdings gezeigt werden, dass GCA2 nicht in der Lage ist, RCAR1 *in vitro* zu phosphorylieren, ebenso wie das aus

derselben Untergruppe der RCAR-Familie stammende RCAR3. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass GCA2 in der Lage ist, RCAR9 und RCAR11 *in vitro* zu phosphorylieren, welche beide anderen RCAR-Untergruppen angehören, als RCAR1. Da eine Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie bisher noch nicht erfolgreich war, kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Phosphorylierungen eventuell relevant sein könnten oder was für eine Rolle sie spielen könnten. Aufgrund der Vielzahl möglicher ABA-Rezeptorkomplexe aus den 14 RCARs und den 9 Gruppe-A-PP2Cs wäre es durchaus möglich, dass neben der Einschränkung der Kombinationsmöglichkeiten durch die spezifischen Expressionsmuster dieser Gene auch noch eine weitere Regulationsebene existiert. So wäre eine Anpassung der ABA-Antwort an verschiedene Stimuli durch spezifische Modifikationen der Rezeptorkomponenten denkbar, welche unter anderem auch Phosphorylierungen beinhalten könnten.

4.4. Welche zusätzlichen Faktoren interagieren mit GCA2?

Bei GCA2 handelt es sich um eine plasmamembranassoziierte calciumabhängige Proteinkinase, welche an der ABA-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* beteiligt ist. Aufgrund der Tatsache, dass GCA2 neben den Schließzellen auch in Epidermiszellen sowie in der Wurzelspitze und besonders in auswachsenden Wurzelhaaren zu finden ist (Korte 2009), legt die Vermutung nahe, dass es neben der Regulation der Spaltöffnungen noch an weiteren Prozessen beteiligt sein könnte. Eine Rolle in der ABA-abhängigen Genexpression wäre aufgrund der Phosphorylierung von ABF1 naheliegend, allerdings konnte bisher noch keine Kernlokalisierung des GCA2-Proteins beobachtet werden (Korte 2009). Neben dem pleiotrop ABA-insensitiven Phänotyp und deutlich gestörter Calciumsignale in den Schließzellen (Allen *et al.* 2001) zeigt die *gca2-1*-Mutante auch eine auffällig niedrige Wuchshöhe sowie eine verfrühte Seneszenz der Rosettenblätter. Um weitere Faktoren zu identifizieren, welche an GCA2-vermittelten Prozessen in der Kontrolle des vegetativen Wachstums beteiligt sind, wurden mehrere Populationen mittels EMS mutagenisierter *gca2-1*-Pflanzen auf Unterdrückung des Wachstumsphänotyps dieser Mutante untersucht. Auf diesem Wege wurden bislang zwei Kandidaten für potentielle Supressoren der *gca2-1*-Mutation identifiziert, welche trotz der *gca2-1*-Mutation ein wildtypähnliches Sprosswachstum gepaart mit einer normalisierten ABA-Empfindlichkeit während der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung zeigen. Vielleicht ist es mit Hilfe dieser Mutanten möglich, einige der noch offenen Fragen zur Rolle von GCA2 im Netzwerk der ABA-Signaltransduktion zu klären.

5. Literaturverzeichnis

Abel, S.; Theologis, A. (1998): Transient Gene Expression in Protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. In: JoséM Martínez-Zapater und Julio Salinas (Hg.): *Arabidopsis Protocols*, Bd. 82: Humana Press (Methods in Molecular Biology™), S. 209-217.

Acharya, B. R.; Assmann, S. M. (2009): Hormone interactions in stomatal function. In: *Plant Mol. Biol.* 69 (4), S. 451–462.

Addicott, F. T.; Lyon, J. L.; Ohkuma, K.; Thiessen, W. E.; Carns, H. R.; Smith, O. E.; Cornforth, J. W.; Milborrow, B. V.; Ryback, G.; Wareing, P. F. (1968): Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin). In: *Science* 159 (3822), S. 1493.

Adie, B. A. T.; Perez-Perez, J.; Perez-Perez, M. M.; Godoy, M.; Sanchez-Serrano, J.-J.; Schmelz, E. A.; Solano, R. (2007): ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 19 (5), S. 1665–1681.

Allen, G. J.; Chu, S. P.; Harrington, C. L.; Schumacher, K.; Hoffmann, T.; Tang, Y. Y.; Grill, E.; Schroeder, J. I. (2001): A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. In: *Nature* 411 (6841), S. 1053–1057.

Allen, G. J.; Chu, S. P.; Schumacher, K.; Shimazaki, C. T.; Vafeados, D.; Kemper, A.; Hawke, S. D.; Tallman, G.; Tsien, R. Y.; Harper, J. F.; Chory, J.; Schroeder, J. I. (2000): Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. In: *Science* 289 (5488), S. 2338–2342.

Anderson, B. E.; Ward, J. M.; Schroeder, J. I. (1994): Evidence for an Extracellular Reception Site for Abscisic Acid in *Commelina* Guard Cells. In: *Plant Physiol.* 104 (4), S. 1177–1183.

Anderson, J. P. (2004): Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis*. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 16 (12), S. 3460–3479.

Babini, E.; Bertini, I.; Capozzi, F.; Chirivino, E.; Luchinat, C. (2006): A structural and dynamic characterization of the EF-hand protein CLSP. In: *Structure* 14 (6), S. 1029–1038.

Barrero, J. M. (2005): A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. In: *Journal of Experimental Botany* 56 (418), S. 2071–2083.

Batistic, O.; Kudla, J. (2004): Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. In: *Planta* 219 (6), S. 915–924.

Batistič, O.; Waadt, R.; Steinhorst, L.; Held, K.; Kudla, J. (2010): CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. In: *The Plant Journal* 61 (2), S. 211–222.

Belin, C.; Franco, P.-O. de; Bourbousse, C.; Chaignepain, S.; Schmitter, J.-M.; Vavasseur, A.; Giraudat, J.; Barbier-Brygoo, H.; Thomine, S. (2006): Identification of Features Regulating OST1 Kinase Activity and OST1 Function in Guard Cells. In: *Plant physiology* 141 (4), S. 1316–1327.

Benning, Gregor (1999): Positionelle Klonierung des GCA2-Locus aus *Arabidopsis thaliana*. [Mikrofiche-Ausg.]

Bensmihen, S. (2002): The Homologous ABI5 and EEL Transcription Factors Function Antagonistically to Fine-Tune Gene Expression during Late Embryogenesis. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 14 (6), S. 1391–1403.

- Bensmihen, S.** (2005): Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during *Arabidopsis thaliana* embryo maturation. In: *Journal of Experimental Botany* 56 (412), S. 597–603.
- Billker, O.; Dechamps, S.; Tewari, R.; Wenig, G.; Franke-Fayard, B.; Brinkmann, V.** (2004): Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. In: *Cell* 117 (4), S. 503–514.
- Bonetta, D.; McCourt, P.** (1998): Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. In: *Trends in Plant Science* 3 (6), S. 231–235.
- Boudsocq, M.; Barbier-Brygoo, H.; Lauriere, C.** (2004): Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. In: *J Biol Chem* 279 (40), S. 41758–41766.
- Boudsocq, M.; Droillard, M.-J.; Barbier-Brygoo, H.; Laurière, C.** (2007): Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. In: *Plant Mol Biol* 63 (4), S. 491–503.
- Boudsocq, M.; Droillard, M.-J.; Regad, L.; Laurière, C.** (2012): Characterization of *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? In: *The Biochemical journal*.
- Brault, M.; Amiar, Z.; Pennarun, A.-M.; Monestiez, M.; Zhang, Z.; Cornel, D.; Dellis, O.; Knight, H.; Bouteau, F.; Rona, J.-P.** (2004): Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. In: *Plant Physiol.* 135 (1), S. 231–243.
- Bright, J.; Desikan, R.; HANCOCK, J. T.; Weir, I. S.; NEILL, S. J.** (2006): ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. In: *Plant J.* 45 (1), S. 113–122.
- Bruzzone, S.; Moreschi, I.; Usai, C.; Guida, L.; Damonte, G.; Salis, A.; Scarfi, S.; Millo, E.; Flora, A. de; Zocchi, E.** (2007): Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (14), S. 5759–5764.
- Bush, D. S.** (1995): Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46 (1), S. 95–122.
- Chandran, V.; Stollar, E. J.; Lindorff-Larsen, K.; Harper, J. F.; Chazin, W. J.; Dobson, C. M.; Luisi, B. F.; Christodoulou, J.** (2006): Structure of the Regulatory Apparatus of a Calcium-dependent Protein Kinase (CDPK): A Novel Mode of Calmodulin-target Recognition. In: *Journal of Molecular Biology* 357 (2), S. 400–410.
- Chaudhuri; Seal; Gupta** (1999): Autophosphorylation-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase from groundnut. In: *Plant Physiol.* 120 (3), S. 859–866.
- Chehab, E. Wassim; Patharkar, O. Rahul; Hegeman, A. D.; Taybi, T.; Cushman, J. C.** (2004): Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. In: *Plant Physiol* 135 (3), S. 1430–1446.
- Cheng, S.-H.; Willmann, M. R.; Chen, H.-C.; Sheen, J.** (2002): Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. In: *Plant Physiol* 129 (2), S. 469–485.
- Cheng, W.-H.** (2002): A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 14 (11), S. 2723–2743.

- Chinnusamy, V.** (2003): Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. In: ***Journal of Experimental Botany*** 55 (395), S. 225–236.
- Choi, H.; Hong, J.; Ha, J.; Kang, J.; Kim, S. Y.** (2000): ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. In: ***J Biol Chem*** 275 (3), S. 1723–1730.
- Choi, H.-i.; Park, H.-J.; Park, J. Hye; Kim, S.; Im, M.-Y.; Seo, H.-H.; Kim, Y.-W.; Hwang, I.; Kim, S. Young** (2005): Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. In: ***Plant Physiol*** 139 (4), S. 1750–1761.
- Chory, J.; Wu, D.** (2001): Weaving the complex web of signal transduction. In: ***Plant Physiol.*** 125 (1), S. 77–80.
- Christmann, A.; Grill, E.** (2009): Are GTGs ABA's Biggest Fans? In: ***Cell*** 136 (1), S. 21–23.
- Christmann, A.; Hoffmann, T.; Teplova, I.; Grill, E.; Müller, A.** (2005): Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. In: ***Plant Physiol*** 137 (1), S. 209–219.
- Christmann, A.; Moes, D.; Himmelbach, A.; Yang, Y.; Tang, Y.; Grill, E.** (2006): Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses. In: ***Plant Biology*** 8 (3), S. 314–325.
- Christmann, A.; Weiler, E. W.; Steudle, E.; Grill, E.** (2007): A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. In: ***Plant J.*** 52 (1), S. 167–174.
- Christodoulou, J.; Malmendal, A.; Harper, J. F.; Chazin, W. J.** (2004): Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. In: ***J. Biol. Chem.*** 279 (28), S. 29092–29100.
- Clark, S. E.; Williams, R. W.; Meyerowitz, E. M.** (1997): The CLAVATA1 Gene Encodes a Putative Receptor Kinase That Controls Shoot and Floral Meristem Size in Arabidopsis. In: ***Cell*** 89 (4), S. 575–585.
- Cohen, P.** (2000): The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. In: ***Trends in Biochemical Sciences*** 25 (12), S. 596–601.
- Colbran, R. J.** (1992): Regulation and role of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. In: ***Neurochem Int*** 21 (4), S. 469–497.
- Cornforth, J. W.; Milborrow, B. V.; Ryback, G.; Wareing, P. F.** (1965): Chemistry and Physiology of 'Dormins' In Sycamore: Identity of Sycamore 'Dormin' with Abscisic Acid. In: ***Nature*** 205 (4978), S. 1269–1270.
- Craig, T. A.; Watterson, D. M.; Prendergast, F. G.; Haiech, J.; Roberts, D. M.** (1987): Site-specific mutagenesis of the alpha-helices of calmodulin. Effects of altering a charge cluster in the helix that links the two halves of calmodulin. In: ***J. Biol. Chem.*** 262 (7), S. 3278–3284.
- Cutler, S. R.; Rodriguez, P. L.; Finkelstein, R. R.; Abrams, S. R.** (2010): Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. In: ***Annu. Rev. Plant Biol*** 61 (1), S. 651–679.
- Cutler, S.; Ghassemian, M.; Bonetta, D.; Cooney, S.; McCourt, P.** (1996): A Protein Farnesyl Transferase Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. In: ***Science*** 273 (5279), S. 1239–1241.
- da Silva, A. C.; Kendrick-Jones, J.; Reinach, F. C.** (1995): Determinants of ion specificity on EF-hands sites. Conversion of the Ca²⁺/Mg²⁺ site of smooth muscle myosin regulatory light chain into a Ca²⁺-specific site. In: ***J Biol Chem*** 270 (12), S. 6773–6778.

- Dammann, C.; Ichida, A.; Hong, B.; Romanowsky, S. M.; Hrabak, E. M.; Harmon, A. C.; Pickard, B. G.; Harper, J. F.** (2003): Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. In: ***Plant Physiol.*** 132 (4), S. 1840–1848.
- Dardick, C.; Chen, J.; Richter, T.; Ouyang, S.; Ronald, P.** (2006): The Rice Kinase Database. A Phylogenomic Database for the Rice Kinome. In: ***Plant physiology*** 143 (2), S. 579–586.
- Desikan, R.; Griffiths, R.; Hancock, J.; Neill, S.** (2002): A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana. In: ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 99 (25), S. 16314–16318.
- Dietrich, P.; Sanders, D.; Hedrich, R.** (2001): The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. In: ***J. Exp. Bot.*** 52 (363), S. 1959–1967.
- Dietz, K.-J.** (2000): Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. In: ***Journal of Experimental Botany*** 51 (346), S. 937–944.
- Ehrhardt, D. W.; Wais, R.; Long, S. R.** (1996): Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. In: ***Cell*** 85 (5), S. 673–681.
- Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D.; Rohdich, F.** (2004): Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. In: ***Cell Mol Life Sci*** 61 (12), S. 1401–1426.
- Finkelstein, R. R.** (2006): Studies of Abscisic Acid Perception Finally Flower. In: ***THE PLANT CELL ONLINE*** 18 (4), S. 786–791.
- Finkelstein, R. R.; Gampala, S. S. L.; Rock, C. D.** (2002): Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. In: ***Plant Cell*** 14, S. S15-45.
- Finkelstein, R. R.; Lynch, T. J.** (2000): The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. In: ***Plant Cell*** 12 (4), S. 599–609.
- Finkelstein, R.; Gampala, S. S. L.; Lynch, T. J.; Thomas, T. L.; Rock, C. D.** (2005): Redundant and Distinct Functions of the ABA Response Loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. In: ***Plant Mol Biol*** 59 (2), S. 253–267.
- Fuchs, S.; Grill, E.; Meskiene, I.; Schweighofer, A.** (2012): Type 2C Protein Phosphatases (PP2Cs) in Plants. In: ***FEBS Journal***, S. no.
- Fuglsang, A. T.; Guo, Y.; Cuin, T. A.; Qiu, Q.; Song, C.; Kristiansen, K. A.; Bych, K.; Schulz, A.; Shabala, S.; Schumaker, K. S.; Palmgren, M. G.; Zhu, J.-K.** (2007): Arabidopsis Protein Kinase PKS5 Inhibits the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Preventing Interaction with 14-3-3 Protein. In: ***THE PLANT CELL ONLINE*** 19 (5), S. 1617–1634.
- Fujii, H.; Zhu, J.-K.** (2009): Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. In: ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 106 (20), S. 8380–8385.
- Fujita, M.; Fujita, Y.; Noutoshi, Y.; Takahashi, F.; Narusaka, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.** (2006): Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. In: ***Curr. Opin. Plant Biol.*** 9 (4), S. 436–442.
- Fujita, Y.** (2005): AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. In: ***THE PLANT CELL ONLINE*** 17 (12), S. 3470–3488.

- Fujita, Y.; Nakashima, K.; Yoshida, T.; Katagiri, T.; Kidokoro, S.; Kanamori, N.; Umezawa, T.; Fujita, M.; Maruyama, K.; Ishiyama, K.; Kobayashi, M.; Nakasone, S.; Yamada, K.; Ito, T.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009): Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in Arabidopsis. In: *Plant and Cell Physiology* 50 (12), S. 2123–2132.
- Fujita, Y.; Yoshida, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012): Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. In: *Physiologia plantarum*, S. no.
- Furihata, T.; Maruyama, K.; Fujita, Y.; Umezawa, T.; Yoshida, R.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006): Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (6), S. 1988–1993.
- Gajhede, M.; Osmark, P.; Poulsen, F. M.; Ipsen, H.; Larsen, J. N.; van Joost Neerven, R. J.; Schou, C.; Løwenstein, H.; Spangfort, M. D.** (1996): X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. In: *Nat. Struct. Biol.* 3 (12), S. 1040–1045.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K.** (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. In: *Exp. Cell Res.* 50 (1), S. 151–158.
- Ganguly, S.; Singh, M.** (1998): Characterization of a second calcium-dependent protein kinase from winged bean. In: *Phytochemistry* 48 (1), S. 61–70.
- Gao, Y.; Zeng, Q.; Guo, J.; Cheng, J.; Ellis, B. E.; Chen, J.-G.** (2007): Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 52 (6), S. 1001–1013.
- 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.; Hedrich, R.** (2011): Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. In: *Sci Signal* 4 (173), S. ra32.
- Geiger, D.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Marten, I.; Ache, P.; Matschi, S.; Liese, A.; Wellmann, C.; Al-Rasheid, K. A. S.; Grill, E.; Romeis, T.; Hedrich, R.** (2010): Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (17), S. 8023–8028.
- Geiger, D.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Stange, A.; Marten, I.; Bauer, H.; Ache, P.; Matschi, S.; Liese, A.; Al-Rasheid, K. A. S.; Romeis, T.; Hedrich, R.** (2009): Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (50), S. 21425–21430.
- Gifford, J. L.; Walsh, M. P.; Vogel, H. J.** (2007): Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. In: *Biochem. J.* 405 (2), S. 199–221.
- Gilli, R.; Lafitte, D.; Lopez, C.; Kilhoffer, M.-C.; Makarov, A.; Briand, C.; Haiech, J.** (1998): Thermodynamic Analysis of Calcium and Magnesium Binding to Calmodulin †. In: *Biochemistry* 37 (16), S. 5450–5456.
- Gobert, A.; Isayenkov, S.; Voelker, C.; Czempinski, K.; Maathuis, F. J. M.** (2007): The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (25), S. 10726–10731.

Literatur

- Gómez-Gómez, L.; Boller, T.** (2000): FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. In: ***Mol. Cell*** 5 (6), S. 1003–1011.
- Gonzalez-Guzman, M.; Apostolova, N.; Belles, J. M.; Barrero, J. M.; Piqueras, P.; Ponce, M. R.; Micol, J. L.; Serrano, R.; Rodriguez, P. L.** (2002): The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. In: ***Plant Cell*** 14 (8), S. 1833–1846.
- Gosti, F.; Beaudoin, N.; Serizet, C.; Webb, A. A.; Vartanian, N.; Giraudat, J.** (1999): ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. In: ***Plant Cell*** 11 (10), S. 1897–1910.
- Grabarek, Z.** (2005): Structure of a Trapped Intermediate of Calmodulin: Calcium Regulation of EF-hand Proteins from a New Perspective. In: ***Journal of Molecular Biology*** 346 (5), S. 1351–1366.
- Grill, E.; Himmelbach, A.** (1998): ABA signal transduction. In: ***Current Opinion in Plant Biology*** 1 (5), S. 412–418.
- Guo, Y.; Xiong, L.; Song, C.-P.; Gong, D.; Halfter, U.; Zhu, J.-K.** (2002): A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. In: ***Dev. Cell*** 3 (2), S. 233–244.
- Hamilton, D. W.; Hills, A.; Kohler, B.; Blatt, M. R.** (2000): Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. In: ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 97 (9), S. 4967–4972.
- Harmon, A. C.; Gribskov, M.; Harper, J. F.** (2000): CDPKs – a kinase for every Ca²⁺ signal? In: ***Trends in Plant Science*** 5 (4), S. 154–159.
- Hashimoto, K.; Kudla, J.** (2011): Calcium decoding mechanisms in plants. In: ***Biochimie*** 93 (12), S. 2054–2059.
- Hashimoto, M.; Negi, J.; Young, J.; Israelsson, M.; Schroeder, J. I.; Iba, K.** (2006): Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. In: ***Nat Cell Biol*** 8 (4), S. 391–397.
- Hathaway, G. M.; Tuazon, P. T.; Traugh, J. A.** (1983): [33] Casein kinase I. In: *Methods in Enzymology*; Elsevier, S. 308–317.
- Hedrich, R.; Busch, H.; Raschke, K.** (1990): Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. In: ***EMBO J*** 9 (12), S. 3889–3892.
- Hegeman, A. D.; Rodriguez, M.; Han, B. Woo; Uno, Y.; Phillips, G. N.; Hrabak, E. M.; Cushman, J. C.; Harper, J. F.; Harmon, A. C.; Sussman, M. R.** (2006): A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. In: ***Proteomics*** 6 (12), S. 3649–3664.
- Himmelbach, A.; Hoffmann, T.; Leube, M.; Höhener, B.; Grill, E.** (2002): Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. In: ***EMBO J*** 21 (12), S. 3029–3038.
- Himmelbach, A.; Iten, M.; Grill, E.** (1998): Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. In: ***Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci*** 353 (1374), S. 1439–1444.
- Hirayama, T.; Shinozaki, K.** (2007): Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. In: ***Trends in Plant Science*** 12 (8), S. 343–351.
- Hoffmann, Thomas (2001): Signaltransduktion von Abscisinsäure in Arabidopsis thaliana. Online verfügbar unter

[http://opac.ub.tum.de/InfoGuideClient.tumsis/start.do?Login=wotum50&Query=10="BV014198608"](http://opac.ub.tum.de/InfoGuideClient.tumsis/start.do?Login=wotum50&Query=10=).

Hosy, E.; Vavasseur, A.; Mouline, K.; Dreyer, I.; Gaymard, F.; Porée, F.; Boucherez, J.; Lebaudy, A.; Bouchez, D.; Very, A.-A.; Simonneau, T.; Thibaud, J.-B.; Sentenac, H. (2003): The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (9), S. 5549–5554.

Hoth, S.; Morgante, M.; Sanchez, J.-P.; Hanafey, M. K.; Tingey, S. V.; Chua, N.-H. (2002): Genome-wide gene expression profiling in Arabidopsis thaliana reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the abi1-1 mutant. In: *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 24), S. 4891–4900.

Hrabak, E. M.; Chan, C. W. M.; 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.; Harmon, A. C. (2003): The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. In: *Plant Physiol* 132 (2), S. 666–680.

Hua, D.; Wang, C.; He, J.; Liao, H.; Duan, Y.; Zhu, Z.; Guo, Y.; Chen, Z.; Gong, Z. (2012): A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHR1, Mediates Abscisic Acid- and Hydrogen Peroxide-Regulated Stomatal Movement in Arabidopsis. In: *The Plant cell*.

HUGOUVIEUX, V.; Kwak, J. M.; Schroeder, J. I. (2001): An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. In: *Cell* 106 (4), S. 477–487.

Hwang, I.; Sze, H.; Harper, J. F. (2000): A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (11), S. 6224–6229.

Inesi, G. (1985): Mechanism of Calcium Transport. In: *Annu. Rev. Physiol.* 47 (1), S. 573–601.

Ishida, S.; Yuasa, T.; Nakata, M.; Takahashi, Y. (2008): A Tobacco Calcium-Dependent Protein Kinase, CDPK1, Regulates the Transcription Factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in Response to Gibberellins. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 20 (12), S. 3273–3288.

Iten, M. (1992): Identifizierung und Charakterisierung von Abscisinsäure-insensitiven Mutanten von Arabidopsis thaliana. Dissertation. ETH Zürich.

Iyer, L. M.; Koonin, E. V.; Aravind, L. (2001): Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. In: *Proteins* 43 (2), S. 134–144.

Jadhav, A. S.; Taylor, D. C.; Giblin, M.; Ferrie, A. M. R.; Ambrose, S. J.; Ross, A. R. S.; Nelson, K. M.; Irina Zaharia, L.; Sharma, N.; Anderson, M.; Fobert, P. R.; Abrams, S. R. (2008): Hormonal regulation of oil accumulation in Brassica seeds: metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of B. napus. In: *Phytochemistry* 69 (15), S. 2678–2688.

Jeannette, E.; Rona, J.-P.; Bardat, F.; Cornel, D.; Sotta, B.; Miginiac, E. (1999): Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in Arabidopsis thaliana suspension cells. In: *Plant J* 18 (1), S. 13–22.

Johnston, C. A.; Temple, B. R.; Chen, J.-G.; Gao, Y.; Moriyama, E. N.; Jones, A. M.; Siderovski, D. P.; Willard, F. S. (2007): Comment on "A G Protein Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid". In: *Science* 318 (5852), S. 914c.

Joshi-Saha, A.; Valon, C.; Leung, J. (2011): A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. In: *Sci Signal* 4 (201), S. re4.

- Kaliff, M.; Staal, J.; Myrenås, M.; Dixelius, C.** (2007): ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. In: **Mol. Plant Microbe Interact.** 20 (4), S. 335–345.
- Kang, J.; Hwang, J.-U.; Lee, M.; Kim, Y.-Y.; Assmann, S. M.; Martinoia, E.; Lee, Y.** (2010): PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107 (5), S. 2355–2360.
- Kang, J.-y.; Choi, H.-i.; Im, M.-Y.; Kim, S. Young** (2002): Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. In: **Plant Cell** 14 (2), S. 343–357.
- Kerk, D.** (2002): The Complement of Protein Phosphatase Catalytic Subunits Encoded in the Genome of Arabidopsis. In: **Plant physiology** 129 (2), S. 908–925.
- Kim, S. Young** (2006): The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. In: **Physiol Plant** 126 (4), S. 519–527.
- Kinoshita, T.; Nishimura, M.; Shimazaki, K.** (1995): Cytosolic Concentration of Ca²⁺ Regulates the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard Cells of Fava Bean. In: **Plant Cell** 7 (8), S. 1333–1342.
- Klüsener, B.; Young, J. J.; Murata, Y.; Allen, G. J.; Mori, I. C.; Hugouvieux, V.; Schroeder, J. I.** (2002): Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in Arabidopsis guard cells. In: **Plant Physiol** 130 (4), S. 2152–2163.
- Kobayashi, M.; Ohura, I.; Kawakita, K.; Yokota, N.; Fujiwara, M.; Shimamoto, K.; Doke, N.; Yoshioka, H.** (2007): Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. In: **THE PLANT CELL ONLINE** 19 (3), S. 1065–1080.
- Koncz, C.; 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. In: **Molecular and General Genetics MGG** 204 (3), S. 383–396.
- Koornneef, M.; Reuling, G.; Karssen, C. M.** (1984): The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. In: **Physiol Plant** 61 (3), S. 377–383.
- Korte, A.** (2009): Identifizierung und Charakterisierung des Abscisinsäure-Responsregulators GCA2 in Arabidopsis thaliana. Dissertation. Technische Universität München.
- Kuromori, T.; Miyaji, T.; Yabuuchi, H.; Shimizu, H.; Sugimoto, E.; Kamiya, A.; Moriyama, Y.; Shinozaki, K.** (2010): ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107 (5), S. 2361–2366.
- Kwak, J. M.; Mori, I. C.; Pei, Z.-M.; Leonhardt, N.; Torres, M. Angel; Dangl, J. L.; Bloom, R. E.; Bodde, S.; Jones, J. D. G.; Schroeder, J. I.** (2003): NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. In: **EMBO J.** 22 (11), S. 2623–2633.
- Lee, J. Y.; Yoo, B. C.; Harmon, A. C.** (1998): Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. In: **Biochemistry** 37 (19), S. 6801–6809.
- Lee, K. Hee; Piao, H. Lan; Kim, H.-Y.; Choi, S. Mi; Jiang, F.; Hartung, W.; Hwang, I.; Kwak, J. M.; Lee, I.-J.; Hwang, I.** (2006): Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. In: **Cell** 126 (6), S. 1109–1120.

- LEE, S. CHUL; Lan, W.; Buchanan, B. B.; Luan, S.** (2009): A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (50), S. 21419–21424.
- Leung, J.** (1997): The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 9 (5), S. 759–771.
- Leung, J.; Giraudat, J.** (1998): ABSCISIC ACID SIGNAL TRANSDUCTION. In: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, S. 199–222.
- Levchenko, V.; Konrad, K. R.; Dietrich, P.; Roelfsema, M. Rob G.; Hedrich, R.** (2005): Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (11), S. 4203–4208.
- Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M.** (1997): Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. In: *FEBS Lett.* 400 (3), S. 271–274.
- Li, J.; Chory, J.** (1997): A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. In: *Cell* 90 (5), S. 929–938.
- Li, J.; Lee, Y. R.; Assmann, S. M.** (1998): Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. In: *Plant Physiol* 116 (2), S. 785–795.
- Liu, X.; Yue, Y.; Li, B.; Nie, Y.; Li, W.; Wu, W.-H.; Ma, L.** (2007): A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid. In: *Science* 315 (5819), S. 1712–1716.
- Lopez-Molina, L.; Mongrand, S.; Chua, N. H.** (2001): A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (8), S. 4782–4787.
- Loukin, S.; Kung, C.** (1995): Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. In: *J. Cell Biol* 131 (4), S. 1025–1037.
- Luan, S.** (2009): The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. In: *Trends in Plant Science* 14 (1), S. 37–42.
- Ludwig, A. A.; Romeis, T.; Jones, J. D. G.** (2004): CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. In: *J. Exp. Bot.* 55 (395), S. 181–188.
- Ludwig, A. A.; Saitoh, H.; Felix, G.; Freymark, G.; Miersch, O.; Wasternack, C.; Boller, T.; Jones, J. D. G.; Romeis, T.** (2005): Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (30), S. 10736–10741.
- Luehrsen, K. R.; Wet, J. R. de; Walbot, V.** [35] Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene, S. 397–414.
- Lu, S. X.; Hrabak, E. M.** (2002): An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. In: *Plant Physiol.* 128 (3), S. 1008–1021.
- M. Iten, T. Hoffmann and E. Grill** (1999): Receptors and Signalling Components of Plant Hormones. In: *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 19.
- MacRobbie, E. A.** (2000): ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁽⁺⁾(Rb⁽⁺⁾) release. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (22), S. 12361–12368.
- Manning, G.** (2002): The Protein Kinase Complement of the Human Genome. In: *Science* 298 (5600), S. 1912–1934.
- Marris, E.** (2008): Water: More crop per drop. In: *Nature* 452 (7185), S. 273–277.

- Martín, M. L.; Busconi, L.** (2000): Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. In: *Plant J.* 24 (4), S. 429–435.
- Ma, Y.; Szostkiewicz, I.; Korte, A.; Moes, D.; Yang, Y.; Christmann, A.; Grill, E.** (2009): Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. In: *Science*.
- McAinsh, M. R.; Webb, A. A.R.; Taylor, J. E.; Hetherington, A. M.** (1995): Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium. In: *Plant Cell* 7 (8), S. 1207–1219.
- Melotto, M.; Underwood, W.; Koczan, J.; Nomura, K.; He, S. Yang** (2006): Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. In: *Cell* 126 (5), S. 969–980.
- Meyer, T.; Stryer, L.** (1988): Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (14), S. 5051–5055.
- Mishra, G.** (2006): A Bifurcating Pathway Directs Abscisic Acid Effects on Stomatal Closure and Opening in Arabidopsis. In: *Science* 312 (5771), S. 264–266.
- Miyazono, K.-i.; Miyakawa, T.; Sawano, Y.; Kubota, K.; Kang, H.-J.; Asano, A.; Miyauchi, Y.; Takahashi, M.; Zhi, Y.; Fujita, Y.; Yoshida, T.; Kodaira, K.-S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Tanokura, M.** (2009): Structural basis of abscisic acid signalling. In: *Nature* 462 (7273), S. 609–614.
- Mizoguchi, M.; Umezawa, T.; Nakashima, K.; Kidokoro, S.; Takasaki, H.; Fujita, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.** (2010): Two Closely Related Subclass II SnRK2 Protein Kinases Cooperatively Regulate Drought-Inducible Gene Expression. In: *Plant and Cell Physiology* 51 (5), S. 842–847.
- Mori, I. C.; Murata, Y.; Yang, Y.; Munemasa, S.; Wang, Y.-F.; Andreoli, S.; Tiriác, H.; Alonso, J. M.; Harper, J. F.; Ecker, J. R.; Kwak, J. M.; Schroeder, J. I.** (2006): CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca²⁺-Permeable Channels and Stomatal Closure. In: *Plos Biol* 4 (10), S. e327.
- Murashige, T.; Skoog, F.** (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. In: *Physiol Plant* 15 (3), S. 473–497.
- Murray, M. G.; Thompson, W. F.** (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic Acids Res* 8 (19), S. 4321–4325.
- Mustilli, A.-C.; Merlot, S.; Vavasseur, A.; Fenzi, F.; Giraudat, J.** (2002): Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. In: *Plant Cell* 14 (12), S. 3089–3099.
- Nambara, E.; Marion-Poll, A.** (2005): Abscisic acid biosynthesis and catabolism. In: *Annu Rev Plant Biol* 56, S. 165–185.
- Nemhauser, J. L.; Hong, F.; Chory, J.** (2006): Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. In: *Cell* 126 (3), S. 467–475.
- Ng, C. K.; Carr, K.; McAinsh, M. R.; Powell, B.; Hetherington, A. M.** (2001): Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. In: *Nature* 410 (6828), S. 596–599.
- Ng, L.-M.; Soon, F.-F.; Zhou, X. E.; West, G. M.; Kovach, A.; Suino-Powell, K. M.; Chalmers, M. J.; Li, J.; Yong, E.-L.; Zhu, J.-K.; Griffin, P. R.; Melcher, K.; Xu, H. E.** (2011): Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA)

signaling SnRK2 kinases. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108 (52), S. 21259–21264.

Nishimura, N.; Hitomi, K.; Arvai, A. S.; Rambo, R. P.; Hitomi, C.; Cutler, S. R.; Schroeder, J. I.; Getzoff, E. D. (2009): Structural Mechanism of Abscisic Acid Binding and Signaling by Dimeric PYR1. In: **Science** 326 (5958), S. 1373–1379.

North, H. M.; Almeida, A. de; Boutin, J.-P.; Frey, A.; To, A.; Botran, L.; Sotta, B.; Marion-Poll, A. (2007): The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. In: **Plant J.** 50 (5), S. 810–824.

Ohkuma, K.; Lyon, J. L.; Addicott, F. T.; Smith, O. E. (1963): Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit (3599), zuletzt aktualisiert am 12.06.2012, zuletzt geprüft am 12.06.2012.

Ohta, M.; Guo, Y.; Halfter, U.; Zhu, J.-K. (2011): A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100 (20), S. 11771–11776.

Okamoto, M. (2006): CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. In: **PLANT PHYSIOLOGY** 141 (1), S. 97–107.

Ozawa, T.; Fukuda, M.; Nara, M.; Nakamura, A.; Komine, Y.; Kohama, K.; Umezawa, Y. (2000): How Can Ca²⁺ Selectively Activate Recoverin in the Presence of Mg²⁺? Surface Plasmon Resonance and FT-IR Spectroscopic Studies †. In: **Biochemistry** 39 (47), S. 14495–14503.

Pandey, S. (2004): The Arabidopsis Putative G Protein-Coupled Receptor GCR1 Interacts with the G Protein Subunit GPA1 and Regulates Abscisic Acid Signaling. In: **THE PLANT CELL ONLINE** 16 (6), S. 1616–1632.

Pandey, S.; Nelson, D. C.; Assmann, S. M. (2009): Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. In: **Cell** 136 (1), S. 136–148.

Park, S.-Y.; Fung, P.; Nishimura, N.; Jensen, D. R.; Fujii, H.; Zhao, Y.; Lumba, S.; Santiago, J.; Rodrigues, A.; Chow, T.-f. F.; Alfred, S. E.; Bonetta, D.; Finkelstein, R.; Provart, N. J.; Desveaux, D.; Rodriguez, P. L.; McCourt, P.; Zhu, J.-K.; Schroeder, J. I.; Volkman, B. F.; Cutler, S. R. (2009a): Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. In: **Science**.

Park, S.-Y.; Fung, P.; Nishimura, N.; Jensen, D. R.; Fujii, H.; Zhao, Y.; Lumba, S.; Santiago, J.; Rodrigues, A.; Chow, T.-f. F.; Alfred, S. E.; Bonetta, D.; Finkelstein, R.; Provart, N. J.; Desveaux, D.; Rodriguez, P. L.; McCourt, P.; Zhu, J.-K.; Schroeder, J. I.; Volkman, B. F.; Cutler, S. R. (2009b): Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. In: **Science**.

Patton, C.; Thompson, S.; Epel, D. (2004): Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. In: **Cell Calcium** 35 (5), S. 427–431.

Peiter, E.; Maathuis, F. J. M.; Mills, L. N.; Knight, H.; Pelloux, J.; Hetherington, A. M.; Sanders, D. (2005): The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. In: **Nature** 434 (7031), S. 404–408.

Pei, Z. M.; Murata, Y.; Benning, G.; Thomine, S.; Klüsener, B.; Allen, G. J.; Grill, E.; Schroeder, J. I. (2000): Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. In: **Nature** 406 (6797), S. 731–734.

Perochon, A.; Aldon, D.; Galaud, J.-P.; Ranty, B. (2011): Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. In: **Biochimie** 93 (12), S. 2048–2053.

- Peshenko, I. V.** (2006): Ca²⁺ and Mg²⁺ Binding Properties of GCAP-1: EVIDENCE THAT Mg²⁺-BOUND FORM IS THE PHYSIOLOGICAL ACTIVATOR OF PHOTORECEPTOR GUANYLYL CYCLASE. In: ***Journal of Biological Chemistry*** 281 (33), S. 23830–23841.
- Pical, C.; Fredlund, K. M.; Petit, P. X.; Sommarin, M.; Møller, I. M.** (1993): The outer membrane of plant mitochondria contains a calcium-dependent protein kinase and multiple phosphoproteins. In: ***FEBS Lett.*** 336 (2), S. 347–351.
- Pierce, M.** (1999): Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions. In: ***Methods*** 19 (2), S. 213–221.
- Pilot, G.; Lacombe, B.; Gaymard, F.; Cherel, I.; Boucherez, J.; Thibaud, J. B.; Sentenac, H.** (2001): Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. In: ***J. Biol. Chem.*** 276 (5), S. 3215–3221.
- Putnam-Evans, C. L.; Harmon, A. C.; Cormier, M. J.** (1990): Purification and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from soybean. In: ***Biochemistry*** 29 (10), S. 2488–2495.
- Radauer, C.; Lackner, P.; Breiteneder, H.** (2008): The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. In: ***BMC Evol Biol*** 8 (1), S. 286.
- Raschke, K.; Shabahang, M.; Wolf, R.** (2003): The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. In: ***Planta*** 217 (4), S. 639–650.
- Razem, F. A.; El-Kereamy, A.; Abrams, S. R.; Hill, R. D.** (2006): The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. In: ***Nature*** 439 (7074), S. 290–294.
- Razem, F. A.; El-Kereamy, A.; Abrams, S. R.; Hill, R. D.** (2008): The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. In: ***Nature*** 456 (7223), S. 824.
- Risk, J. M.; Macknight, R. C.; Day, C. L.** (2008): FCA does not bind abscisic acid. In: ***Nature*** 456 (7223), S. E5-6.
- Roberts, D. M.; Crea, R.; Malecha, M.; Alvarado-Urbina, G.; Chiarello, R. H.; Watterson, D. Martin** (1985): Chemical synthesis and expression of a calmodulin gene designed for site-specific mutagenesis. In: ***Biochemistry*** 24 (19), S. 5090–5098.
- Roberts, D. M.; Harmon, A. C.** (1992): Calcium-Modulated Proteins: Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher Plants. In: ***Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*** 43 (1), S. 375–414.
- Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A.** (2002): Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. In: ***Plant Physiol*** 130 (3), S. 1079–1089.
- Romeis, T.; Ludwig, A. A.; Martin, R.; Jones, J. D.** (2001): Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. In: ***EMBO J*** 20 (20), S. 5556–5567.
- Rubio, S.; Rodrigues, A.; Saez, A.; Dizon, M. B.; Galle, A.; Kim, T.-H.; Santiago, J.; Flexas, J.; Schroeder, J. I.; Rodriguez, P. L.** (2009): Triple Loss of Function of Protein Phosphatases Type 2C Leads to Partial Constitutive Response to Endogenous Abscisic Acid. In: ***PLANT PHYSIOLOGY*** 150 (3), S. 1345–1355.
- Saez, A.; Robert, N.; Maktabi, M. H.; Schroeder, J. I.; Serrano, R.; Rodriguez, P. L.** (2006): Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1 (4), zuletzt aktualisiert am 01.08.2006, zuletzt geprüft am 20.06.2012.

- Saha, P.; Singh, M.** (1995): Characterization of a winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) protein kinase with calmodulin-like domain: regulation by autophosphorylation. In: ***Biochem. J.*** 305 (Pt 1), S. 205–210.
- Saito, S.** (2004): Arabidopsis CYP707As Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid. In: ***PLANT PHYSIOLOGY*** 134 (4), S. 1439–1449.
- Sambrook, Joseph: Molecular cloning. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Online verfügbar unter [http://opac.ub.tum.de/InfoGuideClient.tumsis/start.do?Login=wotum50&Query=540="0-87969-309-6"](http://opac.ub.tum.de/InfoGuideClient.tumsis/start.do?Login=wotum50&Query=540=).
- Sanders, D.** (1999): Communicating with Calcium. In: ***THE PLANT CELL ONLINE*** 11 (4), S. 691–706.
- Sanders, D.; Pelloux, J.; Brownlee, C.; Harper, J. F.** (2002): Calcium at the crossroads of signaling. In: ***Plant Cell*** 14, S. S401-17.
- Santiago, J.; Dupeux, F.; Round, A.; Antoni, R.; Park, S.-Y.; Jamin, M.; Cutler, S. R.; Rodriguez, P. Luis; Márquez, J. Antonio** (2009a): The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. In: ***Nature*** 462 (7273), S. 665–668.
- Santiago, J.; Rodrigues, A.; Saez, A.; Rubio, S.; Antoni, R.; Dupeux, F.; Park, S.-Y.; Márquez, J. Antonio; Cutler, S. R.; Rodriguez, P. L.** (2009b): Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. In: ***The Plant Journal*** 60 (4), S. 575–588.
- Sato, A.; Sato, Y.; Fukao, Y.; Fujiwara, M.; Umezawa, T.; Shinozaki, K.; Hibi, T.; Taniguchi, M.; Miyake, H.; Goto, D. B.; Uozumi, N.** (2009): Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. In: ***Biochem. J*** 424 (3), S. 439–448.
- Scherzer, S.; Maierhofer, T.; Al-Rasheid, K. A. S.; Geiger, D.; Hedrich, R.** (2012): Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels. In: ***Molecular Plant***.
- Schroeder, J. I.; Allen, G. J.; Hugouvieux, V.; Kwak, J. M.; Waner, D.** (2001a): GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. In: ***Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*** 52 (1), S. 627–658.
- Schroeder, J. I.; Hagiwara, S.** (1990): Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. In: ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 87 (23), S. 9305–9309.
- Schroeder, J. I.; Kwak, J. M.; Allen, G. J.** (2001b): Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. In: ***Nature*** 410 (6826), S. 327–330.
- Schroeder, J. I.; Nambara, E.** (2006): A Quick Release Mechanism for Abscisic Acid. In: ***Cell*** 126 (6), S. 1023–1025.
- Schulze, C.; Sticht, H.; Meyerhoff, P.; Dietrich, P.** (2011): Differential contribution of EF-hands to the Ca²⁺-dependent activation in the plant two-pore channel TPC1. In: ***The Plant Journal*** 68 (3), S. 424–432.
- Schuster, S.; Marhl, M.; Höfer, T.** (2002): Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to intercellular signalling. In: ***Eur. J. Biochem.*** 269 (5), S. 1333–1355.
- Schwartz, S. H.; Qin, X.; Zeevaart, J. A.** (2001): Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. In: ***J Biol Chem*** 276 (27), S. 25208–25211.
- Schweighofer, A.; Hirt, H.; Meskiene, I.** (2004): Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. In: ***Trends in Plant Science*** 9 (5), S. 236–243.

- Seo, M.; Peeters, A. J.; Koiwai, H.; Oritani, T.; Marion-Poll, A.; Zeevaert, J. A.; Koornneef, M.; Kamiya, Y.; Koshiba, T. (2000): The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (23), S. 12908–12913.
- Shang, Y.; Yan, L.; Liu, Z.-Q.; Cao, Z.; Mei, C.; Xin, Q.; Wu, F.-Q.; Wang, X.-F.; Du, S.-Y.; Jiang, T.; Zhang, X.-F.; Zhao, R.; Sun, H.-L.; Liu, R.; Yu, Y.-T.; Zhang, D.-P. (2010): The Mg-Chelatase H Subunit of Arabidopsis Antagonizes a Group of WRKY Transcription Repressors to Relieve ABA-Responsive Genes of Inhibition. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 22 (6), S. 1909–1935.
- Sheen, J. (2001): Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. In: *Plant Physiol.* 127 (4), S. 1466–1475.
- Shen, Y.-Y.; Wang, X.-F.; Wu, F.-Q.; Du, S.-Y.; Cao, Z.; Shang, Y.; Wang, X.-L.; Peng, C.-C.; Yu, X.-C.; Zhu, S.-Y.; Fan, R.-C.; Xu, Y.-H.; Zhang, D.-P. (2006): The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. In: *Nature* 443 (7113), S. 823–826.
- Shibata, N.; Kagiya, M.; Nakagawa, M.; Hirano, Y.; Hakoshima, T. (2010): Crystallization of the plant hormone receptors PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 and PYR1/RCAR11 in the presence of (+)-abscisic acid. In: *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* 66 (4), S. 456–459.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000): Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (3), S. 217–223.
- Shiu, S.-H. (2001): Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (19), S. 10763–10768.
- Singh, A.; Giri, J.; Kapoor, S.; Tyagi, A. K.; Pandey, G. K. (2010): Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. In: *BMC Genomics* 11 (1), S. 435.
- Sirichandra, C.; Davanture, M.; Turk, B. E.; Zivy, M.; Valot, B.; Leung, J.; Merlot, S.; Peer, W. A. (2010): The Arabidopsis ABA-Activated Kinase OST1 Phosphorylates the bZIP Transcription Factor ABF3 and Creates a 14-3-3 Binding Site Involved in Its Turnover. In: *PLoS ONE* 5 (11), S. e13935.
- Sirichandra, C.; Gu, D.; Hu, H.-C.; Davanture, M.; Lee, S.; Djaoui, M.; Valot, B.; Zivy, M.; Leung, J.; Merlot, S.; Kwak, J. M. (2009): Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. In: *FEBS Lett* 583 (18), S. 2982–2986.
- Sun, D.; Wang, H.; Wu, M.; Zang, J.; Wu, F.; Tian, C. (2012): Crystal structures of the Arabidopsis thaliana abscisic acid receptor PYL10 and its complex with abscisic acid. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (1), S. 122–127.
- Sun, H.-L.; Wang, X.-J.; Ding, W.-H.; Zhu, S.-Y.; Zhao, R.; Zhang, Y.-X.; Xin, Q.; Wang, X.-F.; Zhang, D.-P. (2011): Identification of an important site for function of the type 2C protein phosphatase ABI2 in abscisic acid signalling in Arabidopsis. In: *Journal of Experimental Botany* 62 (15), S. 5713–5725.
- Sze, H.; Liang, F.; Hwang, I.; Curran, A. C.; Harper, J. F. (2000): DIVERSITY AND REGULATION OF PLANT Ca²⁺ PUMPS. Insights from Expression in Yeast. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51 (1), S. 433–462.
- Szostkiewicz, I.; Richter, K.; Kepka, M.; Demmel, S.; Ma, Y.; Korte, A.; Assaad, F. F.; Christmann, A.; Grill, E. (2010): Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. In: *The Plant Journal* 61 (1), S. 25–35.

- Szyroki, A.; Ivashikina, N.; Dietrich, P.; Roelfsema, M. R.; Ache, P.; Reintanz, B.; Deeken, R.; Godde, M.; Felle, H.; Steinmeyer, R.; Palme, K.; Hedrich, R. (2001): KAT1 is not essential for stomatal opening. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (5), S. 2917–2921.
- Teige, M.; Scheikl, E.; Eulgem, T.; Dóczi, R.; Ichimura, K.; Shinozaki, K.; Dangl, J. L.; Hirt, H. (2004): The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. In: *Molecular Cell* 15 (1), S. 141–152.
- Thingholm, T. E.; Jensen, O. N.; Robinson, P. J.; Larsen, M. R. (2007): SIMAC (Sequential Elution from IMAC), a Phosphoproteomics Strategy for the Rapid Separation of Monophosphorylated from Multiply Phosphorylated Peptides. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 7 (4), S. 661–671.
- Torres-Zabala, M. de; Truman, W.; Bennett, M. H.; Lafforgue, G.; Mansfield, J. W.; Rodriguez Egea, P.; Bögre, L.; Grant, M. (2007): Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. In: *EMBO J* 26 (5), S. 1434–1443.
- Trewavas, A.; Gilroy, S. (1991): Signal transduction in plant cells. In: *Trends Genet* 7 (11-12), S. 356–361.
- Uno, Y.; Furihata, T.; Abe, H.; Yoshida, R.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000): Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (21), S. 11632–11637.
- van LAREBEKE, N.; ENGLER, G.; HOLSTERS, M.; van DEN ELSACKER, S.; ZAENEN, I.; SCHILPEROORT, R. A.; SCHELL, J. (1974): Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability. In: *Nature* 252 (5479), S. 169–170.
- Verslues, P. E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J.; Zhu, J.-K. (2006): Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. In: *The Plant Journal* 45 (4), S. 523–539.
- Vitart; Christodoulou; Huang; Chazin; Harper (2000): Intramolecular activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. In: *Biochemistry* 39 (39), S. 12102.
- Vlad, F.; Rubio, S.; Rodrigues, A.; Sirichandra, C.; Belin, C.; Robert, N.; Leung, J.; Rodriguez, P. L.; Lauriere, C.; Merlot, S. (2009): Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 21 (10), S. 3170–3184.
- Walker, John M. (Hg.) (2002): SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Peptides. New Jersey: Humana Press.
- Wang, D. (2003): Systematic Trans-Genomic Comparison of Protein Kinases between Arabidopsis and Saccharomyces cerevisiae. In: *Plant physiology* 132 (4), S. 2152–2165.
- Wang, X. Q.; Ullah, H.; Jones, A. M.; Assmann, S. M. (2001): G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. In: *Science* 292 (5524), S. 2070–2072.
- Wang, X.; Li, X.; Meisenhelder, J.; Hunter, T.; Yoshida, S.; Asami, T.; Chory, J. (2005): Autoregulation and Homodimerization Are Involved in the Activation of the Plant Steroid Receptor BRI1. In: *Developmental Cell* 8 (6), S. 855–865.
- Webb, A. A.; Hetherington, A. M. (1997): Convergence of the abscisic acid, CO₂, and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells. In: *Plant Physiol.* 114 (4), S. 1557–1560.

- Wernimont, A. K.; Amani, M.; Qiu, W.; Pizarro, J. C.; Artz, J. D.; Lin, Y.-H.; Lew, J.; Hutchinson, A.; Hui, R. (2011): Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. In: *Proteins* 79 (3), S. 803–820.
- 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. David; Hui, R. (2010): Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. In: *Nat Struct Mol Biol* 17 (5), S. 596–601.
- Witte, C.-P.; Keinath, N.; Dubiella, U.; Demouliere, R.; Seal, A.; Romeis, T. (2010a): Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated in vivo as part of a kinase cascade that regulates stress response. In: *J Biol Chem* 285 (13), S. 9740–9748.
- Witte, C.-P.; Keinath, N.; Dubiella, U.; Demouliere, R.; Seal, A.; Romeis, T. (2010b): Tobacco Calcium-dependent Protein Kinases Are Differentially Phosphorylated in Vivo as Part of a Kinase Cascade That Regulates Stress Response. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (13), S. 9740–9748.
- Xiong, L.; Ishitani, M.; Lee, H.; Zhu, J. K. (2001): The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. In: *Plant Cell* 13 (9), S. 2063–2083.
- Yamniuk, A. P.; Gifford, J. L.; Linse, S.; Vogel, H. J. (2008): Effects of Metal-Binding Loop Mutations on Ligand Binding to Calcium- and Integrin-Binding Protein 1. Evolution of the EF-Hand? †. In: *Biochemistry* 47 (6), S. 1696–1707.
- Yang, T.; Poovaiah, B. W. (2003): Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. In: *Trends Plant Sci.* 8 (10), S. 505–512.
- Yin, P.; Fan, H.; Hao, Q.; Yuan, X.; Wu, D.; Pang, Y.; Yan, C.; Li, W.; Wang, J.; Yan, N. (2009): Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. In: *Nat Struct Mol Biol* 16 (12), S. 1230–1236.
- Yoshida, R.; Umezawa, T.; Mizoguchi, T.; Takahashi, S.; Takahashi, F.; Shinozaki, K. (2006a): The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. In: *J. Biol. Chem.* 281 (8), S. 5310–5318.
- Yoshida, T.; Fujita, Y.; Sayama, H.; Kidokoro, S.; Maruyama, K.; Mizoi, J.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010): AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. In: *The Plant Journal* 61 (4), S. 672–685.
- Yoshida, T.; Nishimura, N.; Kitahata, N.; Kuromori, T.; Ito, T.; Asami, T.; Shinozaki, K.; Hirayama, T. (2006b): ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. In: *Plant Physiol.* 140 (1), S. 115–126.
- Young, J. J.; Mehta, S.; Israelsson, M.; Godoski, J.; Grill, E.; Schroeder, J. I. (2006): CO(2) signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca(2+)-independent phase, and CO(2) insensitivity of the gca2 mutant. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (19), S. 7506–7511.
- Yunta, C.; Martínez-Ripoll, M.; Zhu, J.-K.; Albert, A. (2011): The Structure of Arabidopsis thaliana OST1 Provides Insights into the Kinase Regulation Mechanism in Response to Osmotic Stress. In: *Journal of Molecular Biology* 414 (1), S. 135–144.
- Zhu, J.-K. (2002): SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (1), S. 247–273.

Literatur

Zhu, S.-Y.; Yu, X.-C.; Wang, X.-J.; Zhao, R.; Li, Y.; Fan, R.-C.; Shang, Y.; Du, S.-Y.; Wang, X.-F.; Wu, F.-Q.; Xu, Y.-H.; Zhang, X.-Y.; Zhang, D.-P. (2007): Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. In: ***THE PLANT CELL ONLINE*** 19 (10), S. 3019–3036.

Anhang

Anhang

Oligonukleotide

Ziel	Konstrukt	Zweck	Vektor	Name	Sequenz 5'->3'
At1g16220	pQE-70_1g16220	Klonierung	pET21A+	622 NheI f	TTGTAGCTAGCATGGGTTTGTGTCATTCGAAAA
At1g16220	pQE-70_1g16220	Klonierung	pET21A+	622 HindII r	TTGTAAAGCTTCAACCATTTTCTCCAGCTACTT
CPK21	pQE-70_CPK21	Klonierung	pQE70	pQE70CPK21Bam	TTGTAGGATCCATGGAATGGAAGCAGTTT
CPK3	pQE-70_CPK3	Klonierung	pQE-70	C3_Sph1_f	TTGTAGCATGCTAGGCCACAGACACACAA
CPK3	pQE-70_CPK3	Klonierung	pQE-70	C3_BamH1_r	TTGTAGGATCCCATTCTGCGTCGGTT
GCA2	pQE-70_GCA2	Klonierung	pQE70	pQE70 GCA2 Bam r	TTGTAGGATCCGTGGAATGGATACTGTT
GCA2	pQE-30_GCA2	Klonierung	pQE30	pQE30 GCA2 Bam f	TTGTAGGATCCGTTGCTTCAGCAGTAA
GCA2	pQE-30_GCA2	Klonierung	pQE30	pQE30 GCA2 Sac r	TTGTAGAGCTCTCAGTGAATGGATACTGTT
GCA2 CPK21	pQE-70_GCA2 pQE-70_GCA2-VK pQE-70_CPK21 pQE70_CPK21-VK	Klonierung	pQE70	pQE70 GCA2 Pae f	TTGTAGCATGCTAGGTTGCTTCAGCAGTA
GCA2 CPK21	pQE-70_GCA2-VK pQE-70_CPK21-VK	Klonierung	pQE-70	pQE70GCA2VK r	TTGTAGGATCCGAATTGCTTCATACGTGATA
OST1	pQE-70_OST1	Klonierung	pQE-70	2.6_Sph1_f	TTGTAGCATGCTAGATCGACCAGCAGTGA
OST1	pQE-70_OST1	Klonierung	pQE-70	2.6_BamH1_r	TTGTAGGATCCCATTGCGTACACAATCTCT
SCS1	pSK_p35S_SCS1	Klonierung	pSK	SCS-BamH1-F	TTGTAGGATCCATGGACTTAAAAAGCAACAACCA
SCS1	pSK_p35S_SCS1	Klonierung	pSK	SCS-Sall-R	TTGTAGTCGACTTAGTTTGAAGGCTCCTCTGTAT
SCS1	pQE-70_SCS1	Klonierung	pQE70	SCS-SphI-F	TTGTAGCATGCTAGACTTAAAAAGCAACAACCA
SCS1	pQE-70_SCS1	Klonierung	pQE70	SCS-BglII-R	TTGTAAGATCTGTTTGAAGGCTCCTCTGTAT
SnRK2.2	pQE-70_SnRK2.2	Klonierung	pQE-70	2.2_Sph1_f	TTGTAGCATGCTAGATCCGGCGACTAAT
SnRK2.2	pQE-70_SnRK2.2	Klonierung	pQE-70	2.2_Bgl2_r	TTGTAAGATCTGAGAGCATAAACTATCTCTCCA
SnRK2.3	pQE-70_SnRK2.3	Klonierung	pQE-70	2.3_Sph1_f	TTGTAGCATGCTAGATCGAGCTCCGGTGA
SnRK2.3	pQE-70_SnRK2.3	Klonierung	pQE-70	2.3_BamH1_r	TTGTAGGATCCGAGAGCGTAACTATCTCT
		Marker		GCA2_DeCap_rev	CAAAGACCGTAGGACTTGATGAGACTGAGAATT
		Marker		GCA2_DeCap_for	GAGTTTTCCGGTGTACTGCTGAAGCAAC
		Marker		NGA8_f	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC
		Marker		NGA8_r	GAGGGCAAATCTTTATTTCCGG
		Marker		CAP_er(Ddel)_for	GAGTTTATTCTGTGCCAAGTCCCTG
		Marker		CAP_er(Ddel)_rev	CTAATGTAGTGATCTGCGAGGTAATC

Mutation

ABF1	S27A	SDM		ABF1S27Af	ATTGGCGAGGCAGGCTTCGTTATATTCCTTAACG
ABF1	S27A	SDM		ABF1S27Ar	CGTTAAGGAATATAACGAAGCCTGCCTCGCCAAT
ABF1	S27D	SDM		ABF1S27Df	ATTGGCGAGGCAGGATTCGTTATATTCCTTAACG
ABF1	S27D	SDM		ABF1S27Dr	CGTTAAGGAATATAACGAATCCTGCCTCGCCAAT
ABF1	S28A	SDM		ABF1S28Af	ATTGGCGAGGCAGTCTGCGTTATATTCCTTAACG
ABF1	S28A	SDM		ABF1S28Ar	CGTTAAGGAATATAACGCAGACTGCCTCGCCAAT
ABF1	S28D	SDM		ABF1S28Df	ATTGGCGAGGCAGTCTGATTATATTCCTTAACG

Anhang

ABF1	S28D	SDM		ABF1S28Dr	CGTTAAGGAATATAAATCAGACTGCCTCGCCAAT
ABF1	S31A	SDM		ABF1S31Af	CAGTCTTCGTTATATGCCTTAACGTTTGATGAG
ABF1	S31A	SDM		ABF1S31Ar	CTCATCAAACGTTAAGGCATATAACGAAGACTG
ABF1	S31D	SDM		ABF1S31Df	CAGTCTTCGTTATATGACTTAACGTTTGATGAG
ABF1	S31D	SDM		ABF1S31Dr	CTCATCAAACGTTAAGTCATATAACGAAGACTG
ABF1	T135A	SDM		ABF1T135Af	CTTGAGAGGCAACAGGCTTTAGGGGAAATGACTC
ABF1	T135A	SDM		ABF1T135Ar	GAGTCATTTCCCTAAAGCCTGTTGCCTCTCAAG
ABF1	T135D	SDM		ABF1T135Df	CTTGAGAGGCAACAGACTTAGGGGAAATGACTC
ABF1	T135D	SDM		ABF1T135Dr	GAGTCATTTCCCTAAGTCCTGTTGCCTCTCAAG
ABF1	Y30A	SDM		ABF1Y30Af	AGGCAGTCTTCGTTAGCTTCTTAACGTTTGATG
ABF1	Y30A	SDM		ABF1Y30Ar	CATCAAACGTTAAGGAAGCTAACGAAGACTGCCT
ABF1	Y30D	SDM		ABF1Y30Df	AGGCAGTCTTCGTTAGATTCTTAACGTTTGATG
ABF1	Y30D	SDM		ABF1Y30Dr	CATCAAACGTTAAGGAATCTAACGAAGACTGCCT
ABI2	D165A	SDM		ABI2_D165A_for	TTCTTTGGTGTTCACGCTGGCCATGGCGGTTCT
ABI2	D165A	SDM		ABI2_D165A_rev	AGAACCGCCATGGCCAGCGTAAACACCAAAGAA
ABI2	S101A	SDM		ABI2_S101A_for	TACTTAGTAGAACAGAGGCTAGAAGTCTGTTTGA GT
ABI2	S101A	SDM		ABI2_S101A_rev	ACTCAAACAGAGTTCTAGCCTCTGTTCTACTAAGT A
ABI2	S101D	SDM		ABI2_S101D_for	TACTTAGTAGAACAGAGGATAGAAGTCTGTTTGA GT
ABI2	S101D	SDM		ABI2_S101D_rev	ACTCAAACAGACTTCTATCCTCTGTTCTACTAAGTA GTAGAACAGAGAGTAGAGCTCTGTTTGTGAGTTCAA GT
ABI2	S103A	SDM		ABI2_S103A_for	ACTTGAACCTCAAACAGAGCTCTACTCTCTGTTCTA C
ABI2	S103A	SDM		ABI2_S103A_rev	GTAGAACAGAGAGTAGAGATCTGTTTGTGAGTTCAA GT
ABI2	S103D	SDM		ABI2_S103D_for	ACTTGAACCTCAAACAGATCTCTACTCTCTGTTCTAC
ABI2	S103D	SDM		ABI2_S103D_rev	TACTTAGTAGAACAGAGGATAGAGATCTGTTTGA GT
ABI2	S101D S103D	SDM		S101_S103D_for	ACTCAAACAGATCTCTATCCTCTGTTCTACTAAGTA GGAGTTTTGTGACGGTGACGATTGGCAAGAGAA GT
ABI2	S101D S103D	SDM		S101_S103D_rev	ACTCAAACAGATCTCTATCCTCTGTTCTACTAAGTA GGAGTTTTGTGACGGTGACGATTGGCAAGAGAA GT
ABI2	T200D	SDM		T200D_for	ACTTCTTGCCAATCGTCACCGTCACAAAACCTCC GGAGTTTTGTGACGGTGACGATTGGCAAGAGAA GT
ABI2	T200D	SDM		T200D_rev	ACTTCTTGCCAATCGTCACCGTCACAAAACCTCC GGAGTTTTGTGACGGTGACGATTGGCAAGAGAA GT
ABI2	T200A	SDM		T200A_for	ACTTCTTGCCAATCGTCACCGTCACAAAACCTCC TACTTAGTAGAGATGAGGATAGAGATCTGTTTGA GT
ABI2	T200A	SDM		T200A_rev	ACTTCTTGCCAATCGTCACCGTCACAAAACCTCC TACTTAGTAGAGATGAGGATAGAGATCTGTTTGA GT
ABI2	T99D S101D S103D	SDM		TripleD_for	ACTCAAACAGATCTCTATCCTCATCTCTACTAAGTA AGAAAGTACTTAGTAGAGCAGAGAGTAGAAGTCT GT
ABI2	T99D S101D S103D	SDM		TripleD_rev	ACTCAAACAGATCTCTATCCTCATCTCTACTAAGTA AGAAAGTACTTAGTAGAGCAGAGAGTAGAAGTCT GT
ABI2	T99A	SDM		ABI2_T99A_for	ACAGACTTCTACTCTCTGCTCTACTAAGTACTTTCT AGAAAGTACTTAGTAGAGATGAGAGTAGAAGTCT GT
ABI2	T99A	SDM		ABI2_T99A_rev	ACAGACTTCTACTCTCTGCTCTACTAAGTACTTTCT AGAAAGTACTTAGTAGAGATGAGAGTAGAAGTCT GT
ABI2	T99D	SDM		ABI2_T99D_for	ACAGACTTCTACTCTCTGCTCTACTAAGTACTTTCT AGAAAGTACTTAGTAGAGATGAGAGTAGAAGTCT GT
ABI2	T99D	SDM		ABI2_T99D_rev	ACAGACTTCTACTCTCTGCTCTACTAAGTACTTTCT AGAAAGTACTTAGTAGAGATGAGAGTAGAAGTCT GT
GCA2	S233A	SDM		GCA2_S234A_for	CAGGATGTGGCTGGGGCTCTTACTACGTT
GCA2	S233A	SDM		GCA2_S234A_rev	AACGTAGTAAGGAGCCCCAGCCACATCCTG
GCA2	S233D	SDM		GCA2_S234D_for	CAGGATGTGGCTGGGGATCCTTACTACGTT
GCA2	S233D	SDM		GCA2_S234D_rev	AACGTAGTAAGGATCCCCAGCCACATCCTG
GCA2	S339A	SDM		GCA2 S340A for	AGCACCGGACAAGCCTATTGATGCCACTGTGTTAT CACGTATGAAGCAA
GCA2	S339A	SDM		GCA2 S340A rev	TTGCTTCATACGTGATAACACAGTGCCATCAATAG GCTTGCCGGTGCT

Anhang

GCA2	S339A	SDM		GCA2 S340D for	AGCACCGGACAAGCCTATTGATGACACTGTGTTAT CACGTATGAAGCAA
GCA2	S339A	SDM		GCA2 S340D rev	TTGCTTCATACGTGATAACACAGTGCATCAATAG GCTTGCCGGTGCT
GCA2	S340A	SDM		GCA2 T341A for	AGCACCGGACAAGCCTATTGATAGCGCTGTGTTA TCACGTATGAAGCAA
GCA2	S340A	SDM		GCA2 T341A rev	TTGCTTCATACGTGATAACACAGCGCTATCAATAG GCTTGCCGGTGCT
GCA2	S340A	SDM		GCA2 T341D for	AGCACCGGACAAGCCTATTGATAGCGATGTGTTA TCACGTATGAAGCAA
GCA2	S340A	SDM		GCA2 T341D rev	TTGCTTCATACGTGATAACACATCGTATCAATAG GCTTGCCGGTGCT
GCA2	S343A	SDM		GCA2S343Af	GATAGCACTGTGTTAGCACGTATGAAGCAATTC
GCA2	S343A	SDM		GCA2S343Ar	GAATTGCTTCATACGTGCTAACACAGTGTATC
GCA2	S343D	SDM		GCA2S343Df	GATAGCACTGTGTTAGACCGTATGAAGCAATTC
GCA2	S343D	SDM		GCA2S343Dr	GAATTGCTTCATACGGTCTAACACAGTGTATC
GCA2	S362A	SDM		GCA2_S362A_for	GCTAGCCCTAAAGGTTGCTGCGGTGAGTCTATCC
GCA2	S362A	SDM		GCA2_S362A_rev	GGATAGACTCACCGCAGCAACCTTtagggctagc
GCA2	S362D	SDM		GCA2_S362D_for	GCTAGCCCTAAAGGTTGACGCGGTGAGTCTATCC
GCA2	S362D	SDM		GCA2_S362D_rev	GGATAGACTCACCGCTCAACCTTtagggctagc
GCA2	S365A	SDM		GCA2 S365A_for	AAGGTTAGCGCGGTGGCTCTATCCGAAGAAGA
GCA2	S365A	SDM		GCA2 S365A_rev	TCTTCTTCGGATAGAGCCACCGCTAACCTT
GCA2	S365D	SDM		GCA2 S365D_for	AAGGTTAGCGCGGTGGATCTATCCGAAGAAGA
GCA2	S365D	SDM		GCA2 S365D_rev	TCTTCTTCGGATAGATCCACCGCTAACCTT
GCA2	S62D S365D	SDM		GCA2_S362/5DD_f	AAGGTTGACGCGGTGGATCTATCCGAAGAAGA
GCA2	S62D S365D	SDM		GCA2_S362/5DD_r	TCTTCTTCGGATAGATCCACCGCTAACCTT
GCA2	T213A	SDM		GCA2 T214A for	GAGAATGCAATGCTTAAAGTAGCCGATTTTCGGGT TGTCGCGGTTTC
GCA2	T213A	SDM		GCA2 T214A rev	GAACGCGGACAACCCGAAATCGGCTACTTTAAGC ATTGCATTCTC
GCA2	T213D	SDM		GCA2 T214D for	GAGAATGCAATGCTTAAAGTAGACGATTTTCGGGT TGTCGCGGTTTC
GCA2	T213D	SDM		GCA2 T214D rev	GAACGCGGACAACCCGAAATCGTCTACTTTAAGC ATTGCATTCTC
GCA2	T317A	SDM		GCA2T317Af	CCTAAGAGACGAATCGTGCTGAACAGGTTTC
GCA2	T317A	SDM		GCA2T317Ar	GAACCTGTTGAGCAGCGATTGCTCTTAGG
GCA2	T317D	SDM		GCA2T317Df	CCTAAGAGACGAATCGACGCTGAACAGGTTTC
GCA2	T317D	SDM		GCA2T317Dr	GAACCTGTTGAGCGTCGATTGCTCTTAGG
GCA2		SDM		GCA2 Mut GE for	GTTGAGCAACTCGTTGAGCGTCTGATGTGGAT
GCA2		SDM		GCA2 Mut GE rev	ATCCACATCAGACGCTTCAACGAGTTGCTGAAC
OST1	D141A	SDM		D141A for	CAAGTATGTCACCGAGCCTTAAAGCTCGAGAAT
OST1	D141A	SDM		D141A rev	ATTCTCGAGCTTAAAGCTCGGTGACATACTTG
GCA2	S362A	SDM		GCA2_S362A_for	GCTAGCCCTAAAGGTTGCTGCGGTGAGTCTATCC
GCA2	S362A	SDM		GCA2_S362A_rev	GGATAGACTCACCGCAGCAACCTTtagggctagc
GCA2	D193A	SDM		GCA2-TK_for	ggtgtgattcatcgagctctcaagcctgagaa
GCA2	D193A	SDM		GCA2-TK_for	TTCTCAGGCTTGAGAGCTCGATGAATCACACC

Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Erwin Grill dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl unter seiner Betreuung anzufertigen. Er überließ mir spannende Projekte und stand mir jederzeit, trotz oftmals vollem Terminkalender, mit Rat und Tat zur Seite, was sich nicht nur auf konstruktive Diskussionen beschränkte; bei besonderer Not am Mann stellte er sich auch gerne noch spät abends mit ins Labor.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Klaus Lenzian, der mich mitten in meinem Studium der Lebensmittelchemie überhaupt erst auf die Idee brachte, in die Botanik zu kommen, um die Möglichkeiten der Molekularbiologie zu ergründen sowie Dr. Alexander Christmann der immer und für alles einen Rat wusste.

Ich möchte auch allen meinen Kollegen danken, die durch konstruktive Diskussionen und die Aufrechterhaltung eines tollen Betriebsklimas zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders Dr. Arthur Korte, welcher mir, auch noch lange nachdem ich das GCA2-Projekt von ihm geerbt hatte, stets aus der Ferne beistand. Ebenso danke ich unseren technischen Assistenten sowie auch unserem Gärtnerteam für Hilfe und Rat im Laboralltag sowie für die liebevolle Pflege meiner Pflanzen. Ich möchte auch Beate für die bereitwillige Unterstützung im Kampf mit der Bürokratie und die zuverlässige Versorgung mit Süßigkeiten in „Notfallsituationen“ danken. Zu größtem Dank bin ich natürlich denjenigen unter Euch verpflichtet, die auch privat nicht mehr aus meinem Leben wegzudenken sind, oder es auch schon vor meiner Zeit in der Botanik nicht waren, ganz besonders natürlich Esther und Simone, ohne die (mir) in den letzten zehn Jahren alles viel zu bunt geworden wäre.

Weiterhin danke ich auch den Kooperationspartnern in der DFG-Forschergruppe 964 für konstruktiven Austausch und fruchtbare Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt hier Prof. Dr. Michael Hippler (WWU Münster) und seinen Mitarbeitern Dr. Bianca Naumann und Dr. Martin Scholz, ebenso Prof. Dr. Rainer Hedrich und Sönke Scherzer (Universität Würzburg) sowie auch Prof. Dr. Tina Romeis (FU Berlin) und ihrer Arbeitsgruppe.