

Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

Proteinkinasen der Abscisinsäure-Signaltransduktion –
in vitro Charakterisierung und Regulation

Sophie Johanna Pleißner

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. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

2. Univ.-Prof. Dr. Ralph Hüchelhoven

Die Dissertation wurde am 03.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.03.2016 angenommen.

Für meine Familie...

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS..... I

ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VII

ZUSAMMENFASSUNG 1

SUMMARY 3

1. EINLEITUNG 5

1.1 Biotischer und abiotischer Stress auf Pflanzen 5

1.2 Pflanzenhormone 6

 1.2.1 Wachstumsfördernde Phytohormone 7

 1.2.2 Wachstumshemmende Phytohormone 7

 1.2.3 Das Pflanzenhormon Abscisinsäure 8

1.3 Die Abscisinsäure-Signaltransduktion 9

 1.3.1 Der ABA-Rezeptorkomplex..... 11

 1.3.2 PP2C Proteinphosphatasen als Co-Rezeptoren im ABA-Signalweg..... 12

 1.3.3 SnRK Proteinkinasen im ABA-Signalweg 13

 1.3.4 ABF Transkriptionsfaktoren..... 16

1.4 Calcium - ein wichtiger sekundärer Botenstoff der ABA-Signaltransduktion..... 18

1.5 Calciumabhängige Proteinkinasen 19

 1.5.1 Struktur der calciumabhängigen Proteinkinasen 19

 1.5.2 Funktion der calciumabhängigen Proteinkinasen 22

1.6 Funktion der CPK23 Proteinkinase 25

1.7 Zielsetzung der Arbeit..... 27

2. MATERIAL UND METHODEN 29

2.1 Chemikalien und Geräte 29

2.2 Verwendete Bakterienstämme und ihre Medien 31

 2.2.1 Bakterienstämme 31

 2.2.2 Nährmedium und Antibiotika 31

2.3 Arbeiten mit DNA 32

 2.3.1 Plasmid Präparation aus *E.coli* 32

 2.3.2 Polymerasekettenreaktion 32

 2.3.3 Kolonie-Polymerasekettenreaktion 33

 2.3.4 Klonierungsstrategien: Restriktionsverdau, Dephosphorylierung, zielgerichtete Mutagenese, Ligation und Transformation 34

 2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese 35

 2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten 36

INHALTSVERZEICHNIS

2.4 Arbeiten mit Protoplasten	36
2.4.1 Protoplastenpräparation	36
2.4.2 Protoplastentransfektion	37
2.4.3 Enzymatische Messungen in Protoplasten.....	38
2.5 Arbeiten mit Proteinen	39
2.5.1 Anzucht von Bakterien	39
2.5.2 Proteinreinigung	39
2.5.3 Herstellung von Zellextrakt aus Pflanze	41
2.5.4 Nachweis von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese	42
2.5.5 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot	43
2.6 Proteinanalyse	44
2.6.1 Isotherme Titrationskalorimetrie	44
2.6.2 <i>switch-sensor</i> Methode.....	45
2.6.3 Phosphatase-Aktivitätstest	45
2.6.4 Radioaktiver Proteinkinase-Aktivitätstest.....	46
2.6.5 Phosphorylierung zur massenspektrometrischen Auswertung	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1 Detektion calciumabhängiger Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion	49
3.1.1 Detektion des CPK23 Proteins durch N- und C-terminale Peptidantikörper.....	49
3.1.2 Nachweis endogenen CPK23 Proteins im pflanzlichen Zellextrakt	52
3.2 Bestimmung der Ca²⁺ Affinität sowie Ca²⁺ Aktivierung der Proteinkinasen	56
3.2.1 Messung von Ca ²⁺ Affinitäten mittels isothermer Titrationskalorimetrie.....	56
3.2.2 Messung der Ca ²⁺ abhängigen Konformationsänderung durch eine <i>switch-sensor</i> Methode.....	59
3.2.3 Messung der Ca ²⁺ induzierten Proteinkinaseaktivität von CPK23L, CPK23C und CPK21.....	61
3.3 Phosphorylierungsstellen der Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion	65
3.3.1 Autophosphorylierungsstellen der calciumabhängigen Proteinkinasen.....	65
3.3.2 Autophosphorylierungsstellen der OST1 Proteinkinase	67
3.3.3 Intermolekulare Phosphorylierung zwischen CPK23L, CPK23C und OST1	71
3.4 RCAR Proteine als Substrat der Proteinkinasen im ABA-Signalweg	74
3.4.1 Analyse der RCAR Proteine als Substrat der Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1.....	74
3.4.2 Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11	76
3.4.3 Analyse der RCAR11 <i>phosphosite</i> Varianten im radioaktiven Kinase-Aktivitätstest	78
3.4.4 <i>In vivo</i> Analyse der RCAR9, RCAR10 und RCAR11 <i>phosphosite</i> Mutationen	79
3.4.5 Untersuchung einiger RCAR11 <i>phosphosite</i> Varianten im Phosphatase-Aktivitätstest	83
3.5 ABF Transkriptionsfaktoren als Substrat der Proteinkinasen im ABA-Signalweg	85
3.5.1 Analyse der ABFs als Substrat der Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1	85
3.5.2 Phosphorylierungsstellen der ABF Proteine ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5	87
3.5.3 <i>In vivo</i> Analyse der ABF1, ABF2 und ABF3 <i>phosphosite</i> Mutationen	90

INHALTSVERZEICHNIS

3.6 PP2C Proteinphosphatasen als Substrat der Proteinkinasen im ABA-Signalweg	101
3.6.1 Analyse der PP2C Phosphatasen als Substrat der Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1	101
3.6.2 Phosphorylierungsstellen der PP2C Proteine ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1.....	107
3.6.3 Untersuchung des Einflusses von PP2CA auf Proteinkinasen im Protoplastensystem	110
3.6.4 PP2CA Aktivität unter Einfluss der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1.....	113
3.7 Regulation der ABA-Signaltransduktion durch die CPK Proteinkinasen	116
3.8 Untersuchung der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C	119
3.8.1 <i>in vitro</i> Analyse der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C.....	119
3.8.2 <i>in vivo</i> Analyse der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C.....	120
4. DISKUSSION.....	125
4.1 Integriert CPK23 Calciumsignale in die ABA-Signaltransduktion?	125
4.2 Einfluss der CPKs auf die ABA-Signaltransduktion	133
4.3 Unterschiede zwischen CPK23L und CPK23C	143
4.4 Abschließendes hypothetisches Modell der ABA-Signaltransduktion.....	149
5. LITERATURVERZEICHNIS	161
6. ANHANG	183
LEBENS LAUF.....	211

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1 Die wichtigsten wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Phytohormone..... 6

Abb. 1.2 Schematische Darstellung des ABA-Signalwegs 10

Abb. 1.3 Die Proteinfamilie der ABA-Rezeptor Proteine 12

Abb. 1.4 Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion..... 15

Abb. 1.5 Molekulares Mimikry von SnRK2.6/OST1 und RCAR14 an ABI2 bzw. HAB1..... 16

Abb. 1.6 Phylogenetischer Stammbaum der CPK Proteinkinasen sowie CPK Domänenstruktur..... 21

Abb. 1.7 Konformationsänderung der CPKs aufgrund der Ca²⁺ Bindung der Calmodulin-ähnlichen Domäne 22

Abb. 1.8 CPK Interaktionen als Antwort auf abiotischen Stress 24

Abb. 3.1 Bestimmung der Nachweisgrenze und Spezifität der CPK23 Peptidantikörper 51

Abb. 3.2 Western Blot des Zellextrakts zum Nachweis endogenen CPK23 Proteins 53

Abb. 3.3 Untersuchung auf Abbau des CPK23 Proteins im Zellextrakt aus Pflanzenzellkultur 54

Abb. 3.4 Isotherme Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Ca²⁺ Affinität von CPK23L und CPK21 58

Abb. 3.5 *switch-sensor* Messung zur Bestimmung der Ca²⁺ abhängigen Konformationsänderung..... 60

Abb. 3.6 Schematische Darstellung der EF Hand Mutationen 62

Abb. 3.7 Radioaktive Aktivitätsmessungen zur Bestimmung der Ca²⁺ abhängigen CPK Aktivierung..... 64

Abb. 3.8 Autophosphorylierungsstellen der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und CPK21..... 66

Abb. 3.9 Autophosphorylierungsstellen in OST1 sowie Nachweis der OST1 Tyrosin-Phosphorylierung..... 68

Abb. 3.10 Analyse der OST1 Tyrosin¹⁸³ Aktivität sowie Untersuchung der intermolekularen Phosphorylierung 70

Abb. 3.11 Intermolekulare Phosphorylierungsstellen von CPK23L, CPK23C und OST1 72

Abb. 3.12 Phosphorylierung der RCAR Proteine durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 .. 75

Abb. 3.13 Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11..... 76

Abb. 3.14 Phosphorylierung der RCAR11 *phosphosite* Varianten durch CPK23L 78

Abb. 3.15 Transiente Expression der RCAR *phosphosite* Mutationen..... 80

Abb. 3.16 Transiente Expression verschiedener RCAR Versionen..... 82

Abb. 3.17 PP2CA Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von ABA und verschiedener RCAR11 P-Varianten 84

Abb. 3.18 ABF Phosphorylierung durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1..... 86

Abb. 3.19 Phosphorylierungsstellen der ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5 89

Abb. 3.20 Transiente Expression der ABF *phosphosite* Mutationen 90

Abb. 3.21 Transiente Expression der ABF *phosphosite* Mutationen mit CPK23L..... 92

Abb. 3.22 Transiente Expression der ABF *phosphosite* Mutationen mit CPK23C..... 95

Abb. 3.23 Transiente Expression der ABF *phosphosite* Mutationen mit CPK21..... 96

Abb. 3.24 Transiente Expression der ABF *phosphosite* Mutationen mit OST1..... 98

Abb. 3.25 Transiente Expression des ABF1, ABF2 Wildtyps sowie je einer reprimierenden P-Mutante 99

Abb. 3.26 Phosphorylierung der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1..... 102

Abb. 3.27 Phosphorylierung der PP2C Phosphatasen durch CPK21 in Kombination mit verschiedenen RCARs 105

Abb. 3.28 Phosphorylierungsstellen der PP2C Phosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 109

Abb. 3.29 Transiente Koexpression der PP2CA Phosphatase, ABF Transkriptionsfaktoren und OST1 110

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 3.30	Transiente Koexpression der PP2CA Phosphatase, ABF Transkriptionsfaktoren und den CPKs.....	112
Abb. 3.31	PP2CA Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der Proteinkinasekonzentration.....	114
Abb. 3.32	Transiente Koexpression der CPKs und der ABF Transkriptionsfaktoren	117
Abb. 3.33	Aktivität der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C	120
Abb. 3.34	Transiente Koexpression der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L, CPK23C und den ABFs.....	123
Abb. 4.1	Kristallstruktur der Proteinkinase CPK1 aus <i>Toxoplasma gondii</i>	126
Abb. 4.2	Gemessene Ca ²⁺ Affinität von CPK23 und CPK21	127
Abb. 4.3	Regulationsmechanismus der <i>circadian clock</i> in Pflanze.....	133
Abb. 4.4	Sequenzalignment aller RCAR Proteine und Kristallstruktur von HAB1 und RCAR11	136
Abb. 4.5	Schematische Darstellung der ABF Domänenstruktur	138
Abb. 4.6	Sequenzalignment der PP2C Phosphatasen und Kristallstruktur von ABI2 bzw.HAB1 mit RCAR14.....	141
Abb. 4.7	Phosphataseaktivität von ABI2 und PP2CA in Abhängigkeit von CPK12 bzw. CPK23	142
Abb. 4.8	Sequenzalignment des aktiven Zentrums und Kristallstruktur der Proteinkinasen OST1 und TgCPK1 .	148
Abb. 4.9	Vergleichende Darstellung der stressinduzierten Signalwege	150
Abb. 4.10	Schematische Darstellung der gefundenen Interaktionen	153
Abb. 4.11	Hypothetischer Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion	158
Abb. 6.1	Coomasie-Gel der RCAR Proteine.....	183
Abb. 6.2	Western Blot der GST-Fusionsproteine	183

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abscisinsäure
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABF	<i>ABRE binding factor</i>
ABI	<i>ABA insensitive</i>
ABRE	<i>ABA reponse element</i>
AFP	<i>ABI five binding protein</i>
AKT1	<i>Arabidopsis Potassium Transporter 1</i>
AREB	<i>ABA-response element binding protein</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bet v 1	Birkenpollenallergen von <i>Betula verrucosa</i> 1
bZip	<i>Basic leucin zipper</i>
Ca ²⁺	Calciumionen
cADP	cyclisches Adenosindiphosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CPK	Calciumabhängige Proteinkinase
CIPK	<i>CBL interacting protein kinase</i>
CBL	Calcineurin b-like
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
EtOH	Ethanol
FCA	<i>Flowering time control protein</i>
gca2	<i>growth control exerted by ABA2</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hämagglutinin
HAB1/2	<i>homology to ABI1/2</i>
HB6	<i>homeobox-leucine zipper protein</i> ATHB-6
His-tag	Histidin-tag
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Da	Dalton
KAT1	Kalium Kanal KAT1
KEG	<i>keep on going</i>
ko	<i>knockout</i>
LAR	<i>Luciferase assay reagent</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LB	Luria-Bertani
LUC	Luciferase
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MQ	MilliQ; doppelt deionisiertes, steriles Wasser
MUP	Methylumbelliferyl Phosphat
MW	Molekulargewicht
NO	Stickstoffmonoxid
Nod	Nodulation
oD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OST1	<i>Open Stomata 1</i>
P-	Phosphorylierungsstelle/ <i>phosphosite</i>
PP-	Protoplasten-
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
pdb	Protein Data Bank
PEG	Polyethylen Glycol
PP2C	Protein Phosphatase Type 2C
PYR	<i>Pyrabactin resistant</i>
PYL	<i>PYR1-like</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RCAR	<i>Regulatory component of ABA receptor</i>
Rd29B	<i>Responsive to Desiccation 29B</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SCF	<i>Skp1-Cul1-F-box-protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SLAC1	<i>Slow Anion Channel 1</i>
SLAH3	<i>SLAC1 Homolog 3</i>
SnRK2	<i>Sucrose non fermenting1 related protein kinase</i>
SDM	<i>Site directed mutagenesis</i>
T-DNA	Transfer-DNA
tk	inaktive Kinase
wt	Wildtyp
Y2H	<i>yeast2hybrid</i>

ZUSAMMENFASSUNG

Neben den sich täglich wechselnden Temperatur- und Lichtverhältnissen muss sich eine Pflanze als sessiler Organismus auch an den steten Klimawandel anpassen und Regulationswege finden, trotz Kälte-, Salz- oder Trockenstress zu überleben. Von besonderer Relevanz in der Regulation dieser abiotischen Stressbedingungen ist das Phytohormon Abscisinsäure (ABA). Die ABA-abhängige Signaltransduktion unterliegt einer Vielzahl an Komponenten, deren genaues Zusammenspiel noch nicht vollständig entschlüsselt ist. Fokus dieser Arbeit lag auf den Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion CPK23L, CPK23C sowie CPK21 aus der Familie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CPKs) und auf der SnRK2 Proteinkinase OST1. Sowohl die von den Proteinkinasen ausgehende Phosphorylierungskaskade als auch die Integration des sekundären Botenstoffs Calcium durch die CPKs wurde näher untersucht.

Die Phosphorylierungskaskade führte zu massenspektrometrisch bestätigten Phosphorylierungsstellen in den RCAR ABA-Rezeptorproteinen RCAR9, RCAR10 sowie RCAR11, den PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 und in den ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5. Um die Relevanz dieser gefundenen Phosphorylierungsstellen zu bestimmen, wurden *phosphosite* Mutationen in Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Gefunden wurden die Mutationen der Transkriptionsfaktoren ABF1 Threonin³ D und ABF2 Serin⁴⁵ A, welche abhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus eine Inhibierung der ABA-abhängigen Genexpression bewirkten. In diesem Zusammenhang fiel die *phosphosite* Mutante RCAR11 Serin¹²² D auf, die im Phosphatase-Aktivitätstest eine verzögerte ABA-abhängige Inhibierung der PP2CA Phosphatase mit sich brachte. Ebenfalls im Phosphatase-Aktivitätstest konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der PP2CA Proteinphosphatase durch die Proteinkinasen CPK23L und CPK21 detektiert werden. Dieses Ergebnis ging konsistent mit der Beobachtung einher, dass CPK23L und CPK21 als negative Regulatoren *in vivo* identifiziert wurden. Die negative Regulation von CPK23L konnte zudem durch eine Deletion der N-terminalen 14 Aminosäuren aufgehoben werden, was die bedeutende Relevanz dieser Aminosäuren und möglicherweise der Phosphorylierungsstelle CPK23L Serin⁶ aufzeigte.

Generell eröffnete die Zusammenfassung dieser Ergebnisse eine facettenreichere Perspektive auf die bisher postulierte ABA-Signaltransduktion. An Stelle der omnipräsenten PP2C Proteinphosphatasen nehmen womöglich die CPK Proteinkinasen eine übergeordnete Rolle ein, da durch ihre Phosphorylierungskaskade sowohl die Transkriptionsfaktoren als auch die RCAR Rezeptorproteine und die Proteinphosphatasen selbst beeinflusst werden konnten.

SUMMARY

In addition to daily changing temperature- and light-conditions plants as sessile organisms have to cope with the constant climate changes. Therefore, they need to establish metabolic pathways in order to survive cold, salt and drought stress. The phytohormone abscisic acid (ABA) plays a key role during the regulation of various abiotic stresses. The ABA-dependent signal transduction depends on a multiplicity of components whose interactions are not yet fully understood. The focus of this thesis was on the protein kinases of the ABA signal transduction CPK23L, CPK23C and CPK21 out of the family of calcium-dependent protein kinases (CPKs) as well as on the SnRK2 protein kinase OST1. Both the integration of the second messenger calcium in this pathway by the CPKs as well as the phosphorylations cascades were further analyzed.

Mass spectrometry confirmed phosphorylation sites in the RCAR ABA receptors RCAR9, RCAR10 and RCAR11, in PP2C phosphatases ABI1, ABI2, PP2CA and HAB1 as well as in the ABA-dependent transcription factors ABF1, ABF2, ABF3, ABF3 and ABI5 caused by this phosphorylation cascade. To determine the significance of these identified phosphorylation sites *phosphosite* mutations were expressed in mesophyll protoplasts of Arabidopsis. Distinguished variants of the transcription factors ABF1 Threonin³ D and ABF2 Serin⁴⁵ A were found, which showed an inhibition of the ABA-dependent gene expression depending on their phosphorylation status. In this regard the variant RCAR11 Serin¹²² D was identified to delay the ABA-dependent inhibition of the PP2CA phosphatase in the phosphatase activity assay. Likewise by this method a concentration-dependent PP2CA activation was determined by the protein titration of the protein kinases CPK23L and CPK21. This result was in line with the observation that CPK23L and CPK21 are negative regulators of the ABA signaling pathway. Deleting the N-terminal 14 amino acids from CPK23L abolished this negative regulation. This underlines the importance of these amino acids and the putative impact of the CPK23L Serin⁶ phosphorylation site.

The summary of these results opens a multifaceted perspective on the postulated ABA signal transduction. Instead of the omnipresent phosphatases the CPK protein kinases may take over the superior role since their phosphorylation cascade influences transcriptions factors, RCAR receptor proteins as well as PP2C phosphatases.

1. EINLEITUNG

Die heutige Menschheit hat eine Vielzahl an Herausforderungen zu bewältigen, die steigende Weltbevölkerung und steter Klimawandel mit sich bringen. Ersteres führt zu einem Mehrbedarf an Nahrung, dem durch Klimawandel bedingte Ernteauffälle entgegenstehen. So müssen immer mehr Menschen von geringer werdenden Anbauflächen ernährt werden, denn Erosion und Dürren führen zum Verlust von Ackerland und Ernteertrag (Al-Kaisi *et al.*, 2013; van Ittersum *et al.*, 2013; Chakraborty und Newton, 2011, Lobell *et al.*, 2009). Ein für die Zukunft unbekannter Faktor ist die globale Erderwärmung. Von 1901 bis 2012 verlief die durchschnittliche Temperaturänderung regionalabhängig um $-0,53^{\circ}\text{C}$ bis $2,5^{\circ}\text{C}$. Berechnungen zufolge kann sich diese Temperaturerhöhung, abhängig von den Welt CO_2 Emissionen, bis auf durchschnittlich 4°C im Jahr 2100 belaufen, was ein erhöhtes Risiko von Dürren und extremen Wetterphänomenen mit sich bringt (Field *et al.*, 2014, Pachauri und Reisinger, 2007). All dies wird Einfluss auf unsere Agrarkultur nehmen. Um der steigenden Zahl an Menschen gerecht zu werden, müssen die Agrarpflanzen auf limitierten Flächen mit weniger Wasser mehr Ertrag liefern. Dagegen spricht jedoch, dass drei der sechs am häufigsten angebauten Agrarkulturen Weizen, Gerste und Mais aufgrund ansteigender Temperaturen geringeren Ernteertrag liefern (Lobell und Field, 2007). Ein Ansatz dieses Problem zu lösen ist die Arbeit mit gentechnisch veränderten Pflanzen. Um diese Arbeit jedoch gezielt leisten zu können, muss ein grundlegendes Verständnis der biologischen Prozesse innerhalb der Pflanze geschaffen werden. Ein in der Wissenschaft dafür etablierter Modellorganismus ist die Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana*, deren Genom in einem *1001 genomes project* komplett sequenziert wurde (Initiative, 2000; Somerville und Koorneef, 2002).

1.1 Biotischer und abiotischer Stress auf Pflanzen

Im Gegensatz zum Menschen sind Pflanzen sessile Organismen und können Umwelteinflüssen nicht entfliehen. Führen die Umwelteinflüsse zu einer Schädigung der Entwicklung oder des Wachstums der Pflanze, nennt man diese Einflüsse Stress (Lichtenthaler, 1996). Dabei kann zwischen Langzeit- und Kurzzeitstress sowie zwischen leichten und gravierenden Stressfaktoren unterschieden werden, die im schlimmsten Fall bis zum Tod der Pflanze führen (Larcher, 1987). Eine weitere wichtige Unterscheidung von Stress ist die Einteilung in biotischen und abiotischen Stress. Während abiotischer Stress durch Klima und Bodenbeschaffenheit beeinflusst wird, steht biotischer Stress für den Befall von Herbivoren oder Pathogenen (Chakraborty und Newton, 2011; Fujita *et al.*, 2006). Auf beide Stresssituationen muss eine Pflanze schnell reagieren können, um so wenig Schaden wie möglich davon zu tragen. Dazu gehört das Wahrnehmen des Stresses genauso wie die rasche Weiterleitung und eine adäquate Antwort auf diesen Stress. Dies erfolgt meist durch ein präzise abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Pflanzenhormone und sekundärer Botenstoffe (Rejeb *et al.*, 2014).

1.2 Pflanzenhormone

Pflanzenhormone sind kleine niedermolekulare organische Moleküle, die aus dem sekundären Pflanzenmetabolismus gewonnen werden. Schon geringe Konzentrationen der Pflanzenhormone können Änderungen in Wachstum und Entwicklung der Pflanze bewirken. Zu den etablierten Phytohormonen gesellen sich in jüngster Zeit weitere als Phytohormone detektierte Moleküle, wie das vom Carotinoid abgeleitete Strigolactone (Gomez-Roldan *et al.*, 2008), und sogar Peptide wie Systemin, dem eine Funktion als Signalpeptid zugesprochen wird (Ryan und Pearce, 2003). Allgemein unterscheidet man zwischen wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Phytohormonen (Iten *et al.*, 1999), wobei die Einteilung nicht über die chemische Struktur, sondern über deren Wirkungsweise vollzogen wird (siehe Abb. 1.1).

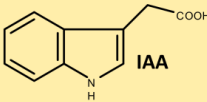
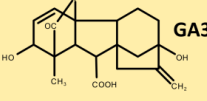
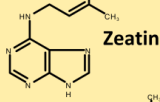
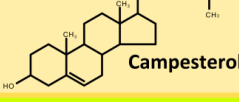

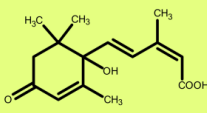
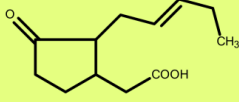

Hormon	Vertreter	Funktion
Auxine	 IAA	Streckungswachstum, Zellteilung, Seitenwurzeln, Apikaldominanz
Gibberelline	 GA3	Streckungswachstum, Keimung, Blütenbildung
Cytokinine	 Zeatin	Zellteilung, Seneszenz
Brassinosteroide	 Campesterol	Streckungswachstum, biotischer/ abiotischer Stress, Zelldifferenzierung
Ethylen		Fruchtreifung, Seneszenz, Epinastie
Abscisinsäure	 H ₃ C, CH ₃ , CH ₃ , CH ₃ , OH, COOH	Regulation der Spaltöffnungen, Keimruhe, Trocken- und Kältetoleranz
Jasmonsäure	 O, COOH, CH ₃	Pathogen- und Wundreaktion
Salizylsäure	 COOH, OH	Thermogenesis, Pathogen Abwehr

Abb. 1.1 Die wichtigsten wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Phytohormone

Die Abbildung zeigt die wichtigsten Phytohormone von links nach rechts mit Namen, Strukturformel und Funktion bzw. dem Einfluss auf die Pflanzenentwicklung. Wachstumsfördernde Phytohormone wurden gelb hinterlegt, während wachstumshemmende grün hinterlegt wurden (Abbildung aus Czap, 2015).

1.2.1 Wachstumsfördernde Phytohormone

Unter guten Umweltbedingungen akkumulieren wachstumsfördernde Phytohormone in der Pflanze. Dabei wirken Pflanzenhormone wie Cytokinine, Auxine, Gibberelline und Brassinosteroide meist synergistisch, können gewebeabhängig jedoch auch antagonistisch wirken. Wie der Name des Hormons schon beschreibt, fördert Cytokinin die Zellteilung und vermindert die Seneszenz (Werner *et al.*, 2001; Gan und Amasino, 1995). Dabei bindet das Cytokinin an Histidin-Proteinkinasen, die über ein Phosphorylierungssignal die Genexpression beeinflussen (Hutchison und Kieber, 2002). Besonders im Apikalmeristem der Wurzel sind Cytokinine nachzuweisen, wo sie antagonistisch mit Auxin zur Differenzierung und Seitenwurzelbildung beitragen. Ein synergistisches Zusammenspiel zwischen Cytokinin und Auxin findet im Sprossmeristem statt und fördert dort das Streckungswachstum (Antoniadi *et al.*, 2015; Schaller *et al.*, 2015). Zudem bestimmt Auxin durch seine basipetale Verteilung die Apikaldominanz (Davies, 2010). Eine Bindung von Auxin an die SCF-ubiquitin Ligase führt zum Abbau von Repressoren und damit einhergehender Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, die zur Expression der Auxin Zielgene führen (Grones und Friml, 2015). Unter anderem wird durch Auxin die Expression der Strigolacton Biosynthese verstärkt (Hayward *et al.*, 2009). Ein ebenso wachstumsförderndes Phytohormon sind Brassinosteroide. Wie Cytokinin und Auxin beeinflussen auch Brassinosteroide das Streckungswachstum der Sprossachse. Dabei werden zum einen Zelldifferenzierung zum anderen biotische und abiotische Stressreaktionen durch dieses Pflanzenhormon reguliert (Müssig und Altmann, 1999; Bajguz und Hayat, 2009; Divi *et al.*, 2015). Unter abiotischen Stress wird ebenfalls eine Regulation durch das Phytohormon Gibberellin nachgewiesen (Colebrook *et al.*, 2014). Die Hauptaufgabe dieses Diterpens liegt allerdings in der Förderung des Streckenwachstums sowie in der Regulation der Blütenbildung und Keimung (Hooley, 1994; Griffiths *et al.*, 2006). Neben diesen wachstumsfördernden Phytohormonen gibt es jedoch auch wachstumshemmende Phytohormone.

1.2.2 Wachstumshemmende Phytohormone

Ein ubiquitäres Phytohormon, das auf die Regulation des Wachstums negativ wirkt, ist Jasmonsäure. Im Zusammenspiel mit dem Phytohormon Salizylsäure bilden diese Hormone die Pathogenabwehr der Pflanze. Während Jasmonsäure bei einer Attacke von biotrophen Erregern die Genexpression kontrolliert, verschiebt sich die Regulation zugunsten der Salizylsäure bei viraler, bakterieller oder fungizider Infektion (Delaney *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 2014; Caillaud *et al.*, 2013). Biotischer wie abiotischer Stress der Pflanze führt zu einer Biosynthese von Ethylen, einem leicht flüchtigen Phytohormon, welches vorwiegend an der Regulation von Fruchtreife, Samenkeimung, Blattfall und Seneszenz beteiligt ist und somit das Pflanzenwachstum unterdrückt (Klee, 2004; Negi *et al.*, 2008). In der Pflanze gibt es fünf verschiedene Ethylenrezeptoren. Für zwei dieser Rezeptoren wurde

gezeigt, dass deren *knockout* Mutanten einen veränderten Phänotyp im Bezug zum Phytohormon Abscisinsäure aufweisen (Wilson *et al.*, 2014). Abscisinsäure spielt eine wichtige Rolle in der Adaption der Pflanze an abiotischen Stress und wird im nachfolgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.2.3 Das Pflanzenhormon Abscisinsäure

Abscisinsäure (ABA) ist ein wichtiges Phytohormon, das besonders bei Wasserdefizit in der Pflanze synthetisiert wird (Cutler *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010). Ausreichende Wasserverfügbarkeit ist für die Pflanze essentiell und nimmt großen Einfluss auf deren Produktion von Biomasse (Schulze, 1986), was wiederum ausschlaggebend für die Agrarindustrie ist (Ben-Ari, 2012; Wilkinson *et al.*, 2012; Sheen, 1996; Park *et al.*, 2015). Abscisinsäure wurde zuerst aus jungen Baumwollfrüchten isoliert und aufgrund seiner Eigenschaft, dass schon geringe Konzentrationen zum Blattabwurf führen, als Abscisin II beschrieben (Ohkuma *et al.*, 1963). Zwei Jahre später wurde vom heutigen Nobelpreisträger John W. Cornforth entdeckt, dass Abscisin II und Dormin identische Moleküle der Summenformel $C_{15}H_{20}O_4$ sind (Cornforth *et al.*, 1965). Abscisinsäure wird auch als Dormin bezeichnet, da es die Keimung hemmt und Samenruhe verlängert (Finkelstein *et al.*, 2008). Generell bewirkt ABA eine Trocken-, Salz- und Kältetoleranz der Pflanze und nimmt damit Einfluss auf Wurzelwachstum und -entwicklung sowie Regulation der Spaltöffnungen (Stomata) (Christmann *et al.*, 2006; De Smet *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010). Zudem wird die Produktion von osmoprotektiven Substanzen angeregt, welche die Zellteilung und das Zellwachstum hingegen verringern (Finkelstein *et al.*, 2002; Himmelbach *et al.*, 2003). Aber auch ohne abiotischen Stress ist ABA in die Entwicklung der Pflanze involviert (Cheng *et al.*, 2002; Barrero *et al.*, 2005). Das monozyklische Sesquiterpen wird über C_{15} -Xanthoxin aus Carotinoid hergestellt und vorwiegend in den Schließzellen, den Zellen des Leitgewebes sowie in den Wurzeln synthetisiert (Christmann *et al.*, 2005; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2001). Jedoch wird ABA nicht nur in Pflanzen synthetisiert, sondern konnte in jüngster Zeit auch in Tieren und sogar im Menschen nachgewiesen werden (Bruzzone *et al.*, 2007). Wie in Pflanzen auch soll ABA dort in der Stressantwort auf Hitze und Licht involviert sein und sogar negativ auf Krebszellen wirken können (Yang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Der Abbau von ABA erfolgt in der Regel über Hydroxylierung mit anschließendem Umbau des Moleküls zu Phaseinsäure bzw. Dihydrophaseinsäure (Cutler und Krochko, 1999; Jadhav *et al.*, 2008). Eine Speicherform der Abscisinsäure stellt das ABA-Glucoseester-Konjugat dar, welches reversibel in freies ABA umgewandelt werden kann (Lee *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012). Dieser Um- und Abbau ist ein wichtiger Regulationsmechanismus des ABA-Hormonhaushaltes, der sich auch auf andere Phytohormone auswirken kann. Denn viele Pflanzenhormone wirken synergistisch oder antagonistisch zueinander, indem unterschiedliche Signalkaskaden ineinander greifen und eine Feinregulation der Pflanzenentwicklung bewirken (Fujita *et al.*, 2006; Spoel und Dong, 2008; Bishopp *et al.*, 2011). Oft entscheidet nur das Mengenverhältnis der Hormone zueinander, welche Signalkaskade aktiviert wird

(Mur *et al.*, 2006). Um den Einfluss von ABA auf diesen Prozess besser zu verstehen, wird nachfolgend die ABA-Signaltransduktion genauer betrachtet.

1.3 Die Abscisinsäure-Signaltransduktion

Rund 10 % aller Gene in Arabidopsis unterliegen der Regulation durch Abscisinsäure. Damit werden durch dieses Phytohormon mehr Gene reguliert als von anderen Phytohormonen (Hoth *et al.*, 2002; Nemhauser *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2011). Dabei findet jedoch die Regulation nicht durch Bindung des ABA-Moleküls an der DNA statt, sondern benötigt eine Signalkaskade, in der das ABA-Molekül über Rezeptoren detektiert und durch weitere Faktoren in eine zelluläre Antwort übersetzt werden kann. Wie bereits oben beschrieben wurde, ist ABA in einer Vielzahl an unterschiedlichen Entwicklungs- und Stressprozessen involviert, was auf ein diverses und verzweigtes Signalweiterleitungssystem schließen lässt. Ein aktiver Import der ABA-Moleküle erfolgt über ABC-Transporter in die Zelle (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010), wo es dort von zytosolischen ABA-Rezeptoren gebunden werden kann (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Durch die Bindung des Moleküls an den ABA-Rezeptor wird es diesem ermöglicht durch posttranslationale Modifikation weitere Proteine zu involvieren und dadurch eine Signalkaskade aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung auszulösen (Fujii *et al.*, 2009). Mit dieser Reaktion geht oft die Freisetzung sekundärer Botenstoffe wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Stickstoffmonoxid (NO), cyclischer ADP-Ribose (cADP), Inositol-Triphosphat (IP₃) oder Calciumionen (Ca²⁺) einher (Schroeder *et al.*, 2001; Bright *et al.*, 2006). Die ABA-Antwort bewirkt einerseits eine schnell ablaufende Reaktion, bei der Ionenkanäle angesprochen werden und damit die Schließung der Stomata innerhalb von 30 Minuten ermöglicht (Kim *et al.*, 2010; Christmann *et al.*, 2007) sowie andererseits eine langsame ABA-Reaktion, die auf das Expressionsmuster der Gene im Nukleus Einfluss nimmt (Fujita *et al.*, 2011; Hubbard *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2015).

EINLEITUNG

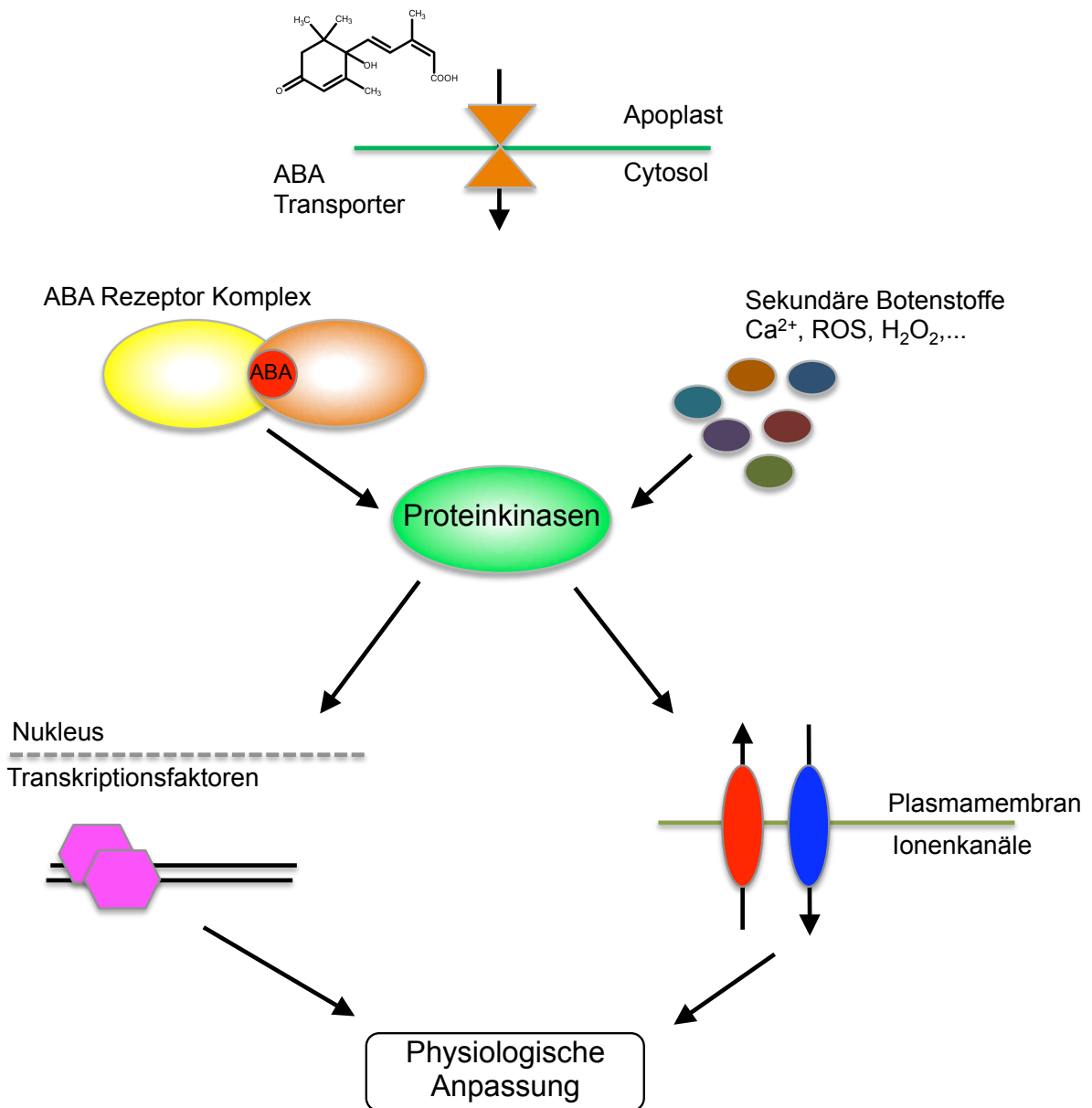


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des ABA-Signalwegs

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Abscisinsäure-Signaltransduktion. Das Phytohormon Abscisinsäure wird über ABC-Transporter in die Zelle transportiert oder aus intrazellulären Speichern freigesetzt. In der Zelle kann ABA von einem Rezeptorkomplex gebunden werden und im Zusammenspiel mit sekundären Botenstoffen Einfluss auf die Proteinkinasen des ABA-Signalwegs nehmen. Diese phosphorylieren Ionenkanäle, welche zu einer Schließung der Stomata führen, sowie Transkriptionsfaktoren, was eine an den Stress adaptierte Genexpression zur Folge hat.

1.3.1 Der ABA-Rezeptorkomplex

Lange Zeit war der Rezeptor des ABA-Moleküls unbekannt und es wurden verschiedene Theorien über extrazelluläre oder intrazelluläre Perzeption diskutiert (Finkelstein *et al.*, 2002). Kurzzeitig war FCA, ein RNA Bindeprotein involviert in der Regulation der Blütezeit, als ABA-Rezeptor veröffentlicht (Razem *et al.*, 2006). Allerdings wurde diese Behauptung von einer anderen Arbeitsgruppe widerlegt, sodass bis zu diesem Zeitpunkt kein ABA-Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Risk *et al.*, 2008). Ein Jahr später war es zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig gelungen den Interaktionspartner des ABA-Moleküls zu identifizieren. Die identischen Proteine wurden jedoch mit unterschiedlichen Bezeichnungen veröffentlicht, da auch die Herangehensweise beider Arbeitsgruppen aus zwei unterschiedlichen Richtungen erfolgte. Auf der einen Seite wurde der Bindungspartner *PYRABACTIN RESISTANCE1* (PYR1) des synthetischen ABA-Antagonisten Pyrabactin identifiziert sowie noch 13 ähnliche Proteine *PYR1-like* (PYL) 1-13 (Park *et al.*, 2009). Auf der anderen Seite wurde mittels *yeast2hybrid* (Y2H) ein Bindungspartner ohne Annotation der im ABA-Signalweg involvierten ABI2 Phosphatase gefunden und *regulatory components of ABA receptors 1* (RCAR1) benannt (Ma *et al.*, 2009). Im Folgenden wird letztere Bezeichnung verwendet. Die RCARs sind eine Familie von 14 Mitgliedern mit einem Molekulargewicht von rund 20 kDa und gehören in die Gruppe der Bet v 1 Superfamilie, da sie eine ähnliche Sekundärstruktur mit 7 antiparallelen Faltblättern um eine lange alpha-Helix aufweisen (Gajhede *et al.*, 1996). Zwei *loop*-Regionen dieses Proteins erfahren nach der Bindung von ABA an RCAR eine Konformationsänderung, wodurch eine optimale Bindestelle für die Proteinphosphatase geschaffen wird. Die Bindetasche von RCAR an die Phosphatase liegt in der Nähe des aktiven Zentrums, sodass eine Substratbindung an die Phosphatase verhindert wird (Miyazono *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009, Santiago *et al.*, 2009a). Die Phosphatase unterstützt durch ein konserviertes Tryptophan die ABA-Bindung an RCAR und erhöht dadurch auch deren Bindungsaffinität (Santiago *et al.*, 2009b). In Komplexbildung mit der Untergruppe A der PP2C (*Protein Phosphatase Type 2C*) Proteinphosphatasen werden für RCAR und ABA Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich bestimmt (Melcher *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Szostkiewicz *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2014). Trotz ihrer sehr homologen Sequenz lassen sich die RCARs in drei Untergruppen, bezogen auf ihre Sequenzhomologie, aufteilen (Raghavendra *et al.*, 2010). Eine Untergruppe, bestehend aus RCAR11, RCAR12, RCAR13 und RCAR14, bildet ohne ABA Homodimere, die sich nur in Anwesenheit von ABA zu Monomeren umwandeln, um mit den PP2C Proteinphosphatasen zu interagieren. Im Gegensatz dazu liegen die RCARs RCAR1, RCAR3, RCAR8, RCAR9 und RCAR10 der anderen zwei Untergruppen sowohl ohne als auch mit ABA als Monomer vor und können bereits ohne Abscisinsäure die Proteinphosphatasen inhibieren (Miyakawa *et al.*, 2013). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie und Struktur wird auf eine ähnliche Funktion der Proteine geschlossen. So zeigen RCAR3, RCAR8, RCAR10, RCAR11, RCAR12 und RCAR14 ähnliches Keimungsverhalten,

Stomataregulation und Genexpression (Park *et al.*, 2009; Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). Der Abbau der RCAR Proteine erfolgt über eine RING-E3 Ubiquitin-Ligase, wodurch vermutlich Einfluss auf die Funktion, Lebenszeit, Protein-Interaktion sowie Lokalisation der ABA-Rezeptoren genommen werden kann (Bueso *et al.*, 2014).

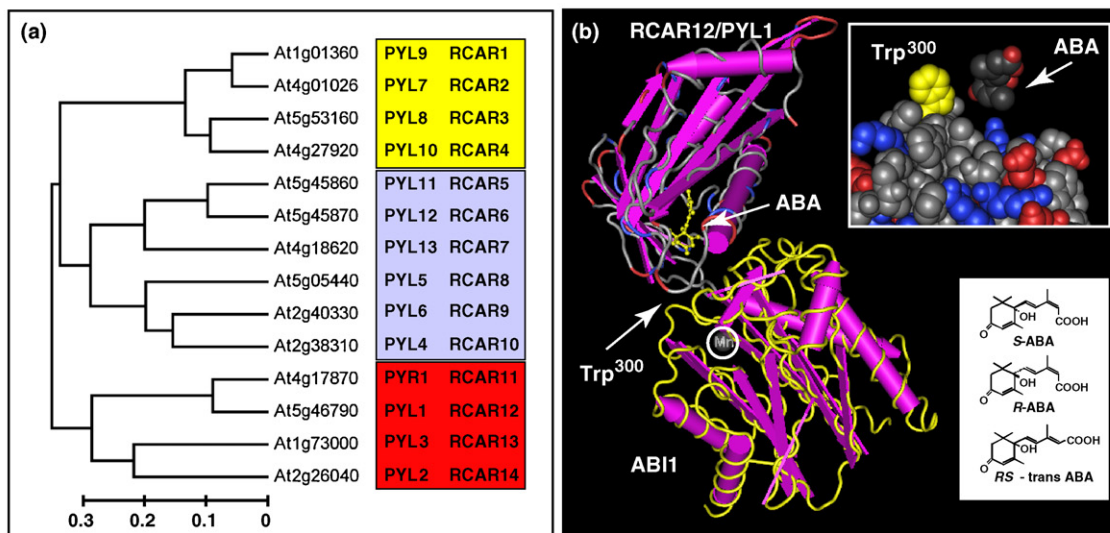


Abb. 1.3 Die Proteinfamilie der ABA-Rezeptor Proteine

In Abbildung A) ist der phylogenetische Stammbaum der PYR/PYL/RCAR Proteine dargestellt. Neben der Genannotation ist auch die jeweilige Bezeichnung als PYR/PYL bzw. RCAR Protein gezeigt. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie sind die RCAR Proteine in 3 Untergruppen aufgeteilt (I gelb, II grau, III rot). Abbildung B) zeigt die Proteinstruktur des Komplexes aus RCAR12 Rezeptor (oben) mit der ABI1 Phosphatase (unten). Das ABA-Molekül sowie das in die Bindung involvierte Tryptophan³⁰⁰ sind durch Pfeile markiert. Die Vergrößerung in der oberen rechten Ecke verdeutlicht die Nähe des ABA-Moleküls zum Tryptophan³⁰⁰ der Phosphatase (gelb hervorgehoben). Darunter sind die Strukturformeln von S-ABA und den physiologisch irrelevanten Stereoisomere von R-ABA sowie RS-trans-ABA zu sehen (Abbildung aus Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. und Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. Trends in Plant Science 15, 395-401. Abgedruckt mit der Erlaubnis von Elsevier).

1.3.2 PP2C Proteinphosphatasen als Co-Rezeptoren im ABA-Signalweg

Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde damit begonnen mittels Mutanten *screens* nach Pflanzen mit einem ABA-insensitiven Phänotyp zu suchen. Dabei ist man auf die Mutanten *abi1* und *abi2* (*abscisic acid insensitive*) gestoßen, die in den ABA-abhängigen Eigenschaften Samenruhe, Wurzelwachstum und Stomataschluss beeinträchtigt waren (Koorneef *et al.*, 1984; Finkelstein und Somerville, 1990). Durch weitere Untersuchungen der *abi1-1* Mutation konnte das Gen letztendlich als Phosphatase identifiziert werden (Leung *et al.*, 1994). In *Arabidopsis thaliana* gibt es insgesamt 80 Proteinphosphatasen, die sich in 12 Untergruppen A-L unterteilen lassen (Xue *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). Allein für die Untergruppe A der Proteinphosphatasen konnte eine Regulation des ABA-Signalwegs nachgewiesen werden (Fuchs *et al.*, 2012). Von diesen wurden besonders die

Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 detailliert charakterisiert und auf ihren Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion untersucht (Gosti *et al.*, 1999; Himmelbach *et al.*, 2002; Sheen, 1998; Meinhard *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Es zeigte sich, dass nur ein einzelner Aminosäureaustausch - G180D in *abi1-1* und G168D in *abi2-1* - für schwächere Enzymaktivität der Phosphatase sowie schwächere Affinität zu Mg²⁺ verantwortlich ist (Bertauche *et al.*, 1996; Leube *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 1997). Generell weisen die *knockout* Mutanten einzelner PP2C Gene keinen starken Phänotyp auf. Erst die Kombination verschiedener *knockout* Mutanten miteinander verändert den ABA-abhängigen Phänotyp (Yoshida *et al.*, 2006; Saez *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2009). Die Vermutung lag nahe, dass eine negative Rückkopplung die Expression der PP2C Proteinphosphatasen induziert (Merlot *et al.*, 2001; Leonhardt *et al.*, 2004). Zudem wird die Expression der PP2C Proteinphosphatasen durch Trocken-, osmotischen- und Salzstress sowie durch exogenes ABA stimuliert (Chan, 2012; Seki *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Choudhury und Lahiri, 2011). Die exprimierten Proteinphosphatasen sind sowohl im Cytosol als auch im Kern lokalisiert, wobei durch Zugabe von exogenem ABA eine Verschiebung hin zur Kernlokalisierung detektiert werden konnte (Reyes *et al.*, 2006; Moes *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009). Im Cytosol sind Proteinphosphatasen in der Regulation der Ionenkanäle involviert und können dadurch die hydrostatischen Eigenschaften der Pflanzenzelle kontrollieren. Aufgrund der Dephosphorylierung durch die PP2Cs werden die Ionenkanäle KAT1 und AKT1 (Cherel *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2009) sowie SLAC1 und SLAH3 inhibiert (Geiger *et al.*, 2011; Geiger *et al.*, 2009; Brandt *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2011). Im Kern beeinflussen PP2Cs die Genexpression, indem sie Transkriptionsfaktoren wie ABFs oder HB6 inaktivieren. Dies kann direkt über eine Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors geschehen (Himmelbach *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2012; Antoni *et al.*, 2012) aber auch indirekt, indem ABF-aktivierende Proteinkinasen dephosphoryliert werden (Fujii *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2013). Generell sind Proteinkinasen ein Hauptsubstrat der Proteinphosphatasen, denn als Gegenspieler der Proteinphosphatasen sind Proteinkinasen in der Lage sich selbst sowie Interaktionspartner zu phosphorylieren und dadurch die Signalweiterleitung zu steuern. Im ABA-Signalweg spielen Proteinkinasen wie *sucrose non-fermenting 1 (SNF1) related protein kinases* (SnRKs) sowie *calcium-dependent protein kinases* (CPKs) eine essentielle Rolle in der Signalweiterleitung und werden über den Phosphorylierungsstatus durch Proteinphosphatasen reguliert (Ohta *et al.*, 2003; Umezawa *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2013).

1.3.3 SnRK Proteinkinasen im ABA-Signalweg

SnRKs sind eine wichtige Komponente der ABA-Signalweiterleitung, die sowohl durch PP2Cs reguliert werden kann, als auch durch Phosphorylierung selbst in der Lage ist, auf die Signalkaskade Einfluss zu nehmen. Die Familie der SnRKs besteht aus 38 Mitgliedern, die aufgrund ihrer Homologie und konservierten Domänenstruktur in drei Gruppen unterteilt sind (Hrabak *et al.*, 2003; Halford und Hardie, 1998). Die erste Gruppe der *sucrose non-fermenting 1 (SNF1) related protein kinases* ist wie

der Name bereits sagt im Zucker- und Energiehaushalt der Pflanze involviert (Hardie, 2007; Mihaylova und Shaw, 2011). Auf diese Untergruppe wird im Folgenden nicht näher eingegangen, da sie, im Gegensatz zur SnRK2- und SnRK3-Klasse, nicht direkt am ABA-Signalweg beteiligt ist, sondern ein Bindeglied zwischen Nährstoff- und Phytohormonhaushalt darstellt (Radchuk *et al.*, 2010). Die Proteinkinasen der SnRK3 Untergruppe sind äquivalent zu den *Calcineurin B like interacting protein kinases* (CIPKs) und können direkt mit CBL (*Calcineurin B like*) Proteinen interagieren, die als Calciumsensoren dienen (Hrabak *et al.*, 2003; Kudla *et al.*, 1999). Durch die Calciumbindung an CBLs erfahren diese eine strukturelle Konformationsänderung, sodass es zu einer Interaktion mit den CIPKs kommen kann (Albrecht *et al.*, 2001; Akaboshi *et al.*, 2008). Die daraus resultierende Proteinkinaseaktivität kann im Falle von CIPK23 Einfluss auf die Regulation von AKT1 nehmen und ermöglicht so eine Verknüpfung von Ca²⁺- und ABA-Signalweg (Cheong *et al.*, 2007). Jedoch kann diese Regulation durch Proteinphosphatasen der Untergruppe A anhand Dephosphorylierung der CIPKs wieder aufgehoben werden (Guo *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2011). Jüngste Ergebnisse weisen darauf hin, dass CIPK Proteine direkt mit dem SnRK2.2 Protein, einem positiven Regulator der ABA-Signaltransduktion, interagieren und dadurch die Mg²⁺-Homöostase der Pflanze steuern (Mogami *et al.*, 2015). SnRK2.2 ist ein Vertreter der SnRK2 Untergruppe, die aus 10 Mitgliedern besteht und die alle durch osmotischen Stress aktiviert werden (Boudsocq *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2011). Drei dieser Mitglieder SnRK2.2 (SnRKD), SnRK2.3 (SnRKI) und SnRK2.6 (SnRKE) verhalten sich redundant in der ABA-abhängigen Regulation von Schließzellen, Samenruhe und Keimung (Fujii und Zhu, 2009; Fujita *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2009). In Untersuchungen der Tripel *snrk2.2/3/6* sowie der Septupel *snrk2.1/4/5/7/8/9/10 knockout* Mutanten wurde für erstere eine ABA-abhängige, für letztere eine ABA-unabhängige Antwort auf osmotischen Stress detektiert (Fujii *et al.*, 2011). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den ABA-abhängigen SnRK2 Proteinkinasen, hier besonders auf SnRK2.6, die auch als OST1 (*open stomata 1*) bezeichnet wird, da die *knockout* Mutante nicht mehr in der Lage ist ihre Stomata zu schließen (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002). Im ABA-Signalweg werden die Proteinkinasen ohne ABA durch PP2C Proteinphosphatasen in einem inaktiven Zustand gehalten (Yoshida *et al.*, 2006; Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009). Durch eine steigende ABA-Konzentration, zum Beispiel bei Trockenstress, erhöht sich die Affinität des RCAR ABA-Rezeptors zu den Proteinphosphatasen, sodass diese durch die RCAR Interaktion inhibiert und im gleichen Zug die Proteinkinasen aktiviert werden. Man konnte nachweisen, dass beide Proteine die gleiche Bindestelle der Phosphatase angehen, wobei OST1 ein molekulares Mimikry der RCAR Bindung an PP2C darstellt (Hao *et al.*, 2011, Xie *et al.*, 2012; Soon *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2012). Die Aktivierung von OST1 erfolgt über die Autophosphorylierung und ermöglicht der Proteinkinase die Phosphorylierung weiterer Substrate im Cytosol und im Zellkern (Vlad *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2011). Im Cytosol sind die Ionenkanäle KAT1 und SLAC1 Substrat der OST1

Proteinkinase und ermöglichen so die ABA-abhängige Regulation der Stomata (Geiger *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009). Im Zellkern ist diese Proteinkinase in der Lage die ABA-abhängige Genexpression zu kontrollieren, indem sie AREB/ABF Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und damit aktiviert (Furihata *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2009; Sirichandra *et al.*, 2010).

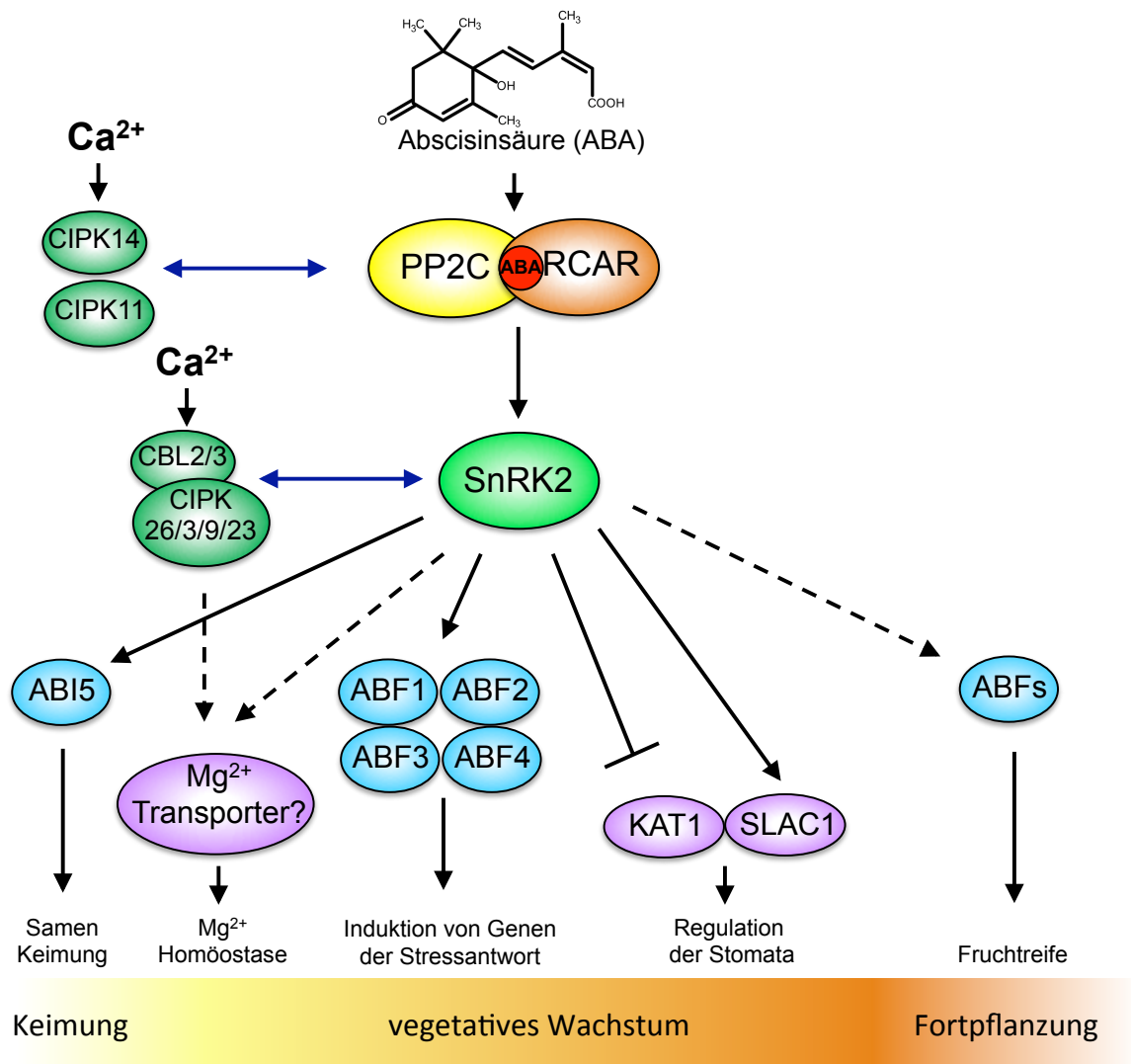


Abb. 1.4 Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion

Vereinfachte Darstellung des ABA-Signalwegs. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Schema aus Yoshida *et al.*, 2015 reduziert. Die Detektion von Abscisinsäure (roter Kreis) erfolgt über den RCAR /PP2C Komplex (braun und gelbe Ellipse), was zu einer Aktivierung der SnRK2 Proteinkinase führt (grüne Ellipse). Dabei kann es zu Interaktionen zwischen weiteren CIPK Proteinkinasen (dunkelgrüne Ellipsen) und PP2C Proteinphosphatasen bzw. zwischen den CIPK Proteinkinasen und SnRK2 kommen (blaue Doppelpfeile). Die in den ABA-Signalweg involvierten Transkriptionsfaktoren sind durch hellblaue Ellipsen gekennzeichnet, während Ionenkanäle durch violette Ellipsen dargestellt sind. Interaktionen, die durch Interaktom Analyse bestätigt wurden, sind durch dunkelblaue Doppelpfeile gekennzeichnet. Gestrichelte Pfeile zeigen noch unbestätigte Interaktionen, schwarze Pfeile zeigen bereits bestätigte Regulationen (abgeändert von Yoshida, T., Mogami, J. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. *Plant Cell Physiology* 56 (6), 1043-1052. Abgedruckt mit der Erlaubnis von Oxford University Press).

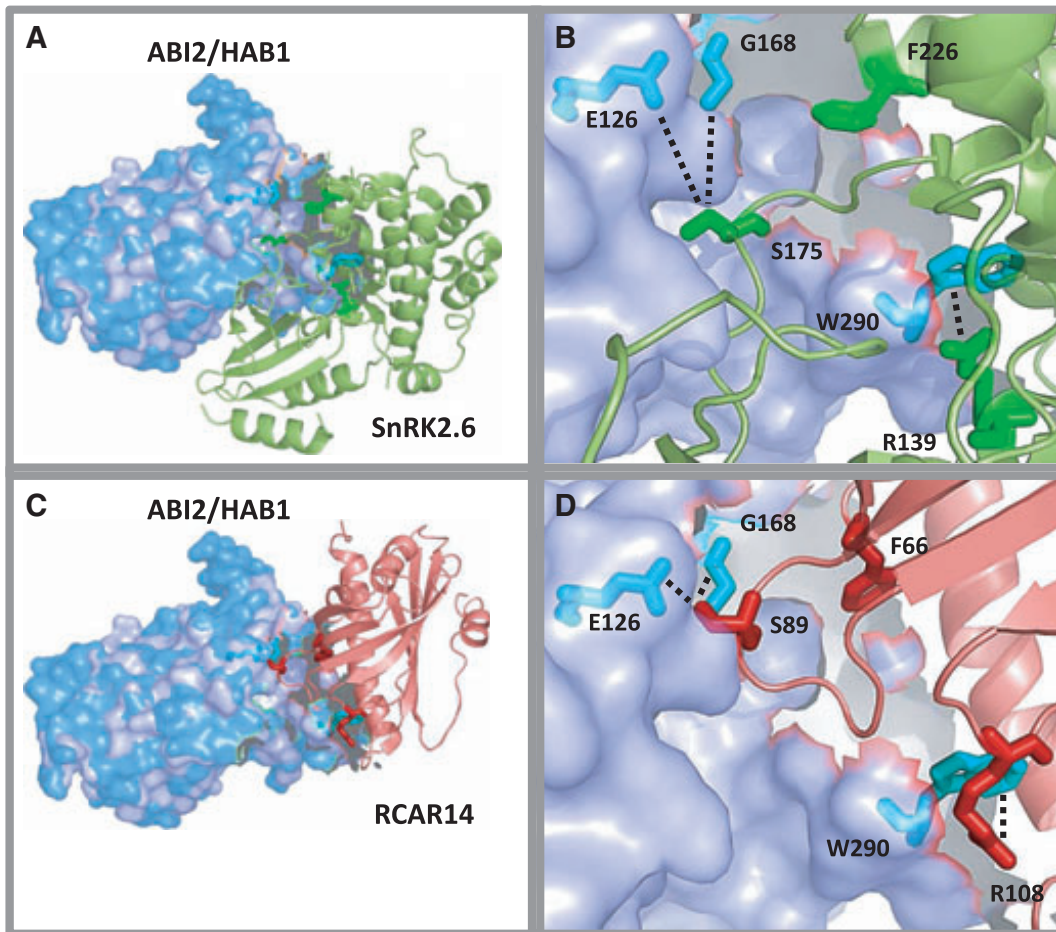


Abb. 1.5 Molekulares Mimikry von SnRK2.6/OST1 und RCAR14 an ABI2 bzw. HAB1

Darstellung des Proteinkomplexes aus ABI2 bzw. HAB1 mit SnRK2.6/OST1 bzw. RCAR14. In A) ist die überlagerte Oberflächenstruktur der PP2C Proteine ABI2 (violett) und HAB1 (blau) in Komplex mit der Proteinkinase SnRK2.6/OST1 (grün) dargestellt. Zur Verdeutlichung der Proteininteraktion wird in B) die Vergrößerung der Interaktionsfläche gezeigt und an der Bindung beteiligte Aminosäuren in *sticks* hervorgehoben. In C) wird die Interaktion zwischen ABI2 bzw. HAB1 sowie RCAR14 (rot) abgebildet und in D) die Vergrößerung der Interaktionsfläche inklusive der beteiligten Aminosäuren. Sowohl in SnRK2.6/OST1 als auch in RCAR14 sind die Aminosäuren F, S, und R an der Bindung zu ABI2 bzw. HAB1 beteiligt (Abbildung aus Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I. und Schweighofer, A. (2012). Type 2C protein phosphatases in plants. *The FEBS Journal* 280, 681-693. Abgedruckt mit der Erlaubnis von John Wiley and Sons).

1.3.4 ABF Transkriptionsfaktoren

Eine direkte ABA-abhängige Regulation der Gene ist nur den Transkriptionsfaktoren vorbehalten, da diese in der Lage sind im Promotor Bereich des Gens zu binden und dadurch die RNA Polymerase zu initiieren. Die Bindung an die DNA erfolgt meist über eine basische Bindedomäne, gefolgt von einem Leucin-Zipper (bZIP) Motiv. Die Familie der bZIP Transkriptionsfaktoren besteht in Arabidopsis aus 75 Mitgliedern, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in 10 Untergruppen aufgeteilt werden können (Jakoby *et al.*, 2002). In der ABA-abhängigen Genexpression spielt die Gruppe der ABF Transkriptionsfaktoren, Untergruppe A der bZIP Transkriptionsfaktoren, eine zentrale Rolle (Finkelstein und Lynch,

2000). ABF Transkriptionsfaktoren wurden im *yeast1hybrid* Versuch entdeckt, da diese Proteine an das *cis*-regulatorische ABRE (*abscisic acid responsive element*) binden können und daher auch ihre Bezeichnung *ABRE binding factors* tragen (Guiltingan *et al.*, 1990; Busk und Pages, 1998; Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Für eine positive Regulation der Genexpression ist jedoch ein ABRE Element nicht ausreichend. Eine vollständige ABA-abhängige Induktion der Gene wird erst durch die Kombination eines proximalen und distalen Bindeelements erreicht (Shen *et al.*, 1996). Die ABF Transkriptionsfaktoren selbst werden unter Trocken- und Salzstress sowie unter Zugabe exogenen ABAs hochreguliert (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Unter den neun Mitgliedern der ABF Transkriptionsfaktoren sind es besonders ABF1, ABF2 (AREB1), ABF3 und ABF4 (AREB2) die durch osmotischen Stress und Trockenstress deutlich induziert werden (Yoshida *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2015). Die ABA-abhängige Phosphorylierung ist die ausschlaggebende posttranslationale Modifikation, die über die Aktivierung dieser ABF Transkriptionsfaktoren entscheidet (Kobayashi *et al.*, 2005; Muniz Garcia *et al.*, 2012). Viele der in den ABF konservierten R-X-X-S/-T Phosphorylierungsstellen werden von der OST1 Proteinkinase phosphoryliert, für die eine Co-Lokalisation mit den ABFs im Kern nachgewiesen werden konnte (Furihata *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2010). Eine ebensolche konservierte Phosphorylierungsstelle wurde auch im ABF homologen Transkriptionsfaktor ABI5 (*ABA insensitive 5*) nachgewiesen (Furihata *et al.*, 2006). ABI5 gehört, wie die ABFs, zu den bZIP-Transkriptionsfaktoren und kann an ABRE-Elemente binden. Seine Entdeckung verlief parallel zu den ABI3 und ABI4 Transkriptionsfaktoren auf der Suche nach ABA-resistenter Keimung, wobei die Expression von ABI5 durch ABI3 und ABI4 reguliert werden kann (Reeves *et al.*, 2011; Finkelstein *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2010). In Anwesenheit von ABA kommt es zu einer Stabilisierung und Akkumulierung dieses Proteins im Zellkern, was vermutlich auf einer Bindung mit 14-3-3 Proteinen beruht (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Sirichandra *et al.*, 2010). Ist die Pflanze keiner Stresssituation ausgesetzt, sollten die ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren nicht aktiv sein. Dies wird einerseits über den Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors, andererseits über dessen direkten Abbau erreicht. Eine Dephosphorylierung kann direkt durch die im ABA-Signalweg involvierten PP2C Proteinphosphatasen vorgenommen werden, oder indirekt durch die Inaktivierung der ABF aktivierenden Proteinkinasen (Lynch *et al.*, 2012; Fujii *et al.*, 2007). Der Abbau des ABI5 Transkriptionsfaktors erfolgt durch die Bindung des AFP (*ABI five binding protein*) Proteins an einer konservierten Domäne. Da diese Domäne auch in den ABF Transkriptionsfaktoren konserviert ist, kann man davon ausgehen, dass auch diese von AFP gebunden werden (Lopez-Molina *et al.*, 2003). Durch eine mögliche Phosphorylierung des AFP Proteins durch die KEG (*KEEP ON GOING*) E3 Ligase kann es zum Abbau der Transkriptionsfaktoren über das 26S Proteasom kommen (Stone *et al.*, 2006).

1.4 Calcium - ein wichtiger sekundärer Botenstoff der ABA-Signaltransduktion

Calcium ist das fünft häufigste Element der Erdkruste und in einer biologischen Zelle von größter Relevanz (Jaiswal, 2001). Der Umgang mit Calcium birgt für eine Zelle sowohl Vor- als auch Nachteile. So kann Calcium in höheren Konzentrationen toxisch auf die Zelle wirken, da es sowohl mit Proteinen als auch mit DNA, Lipidmembranen und Phosphaten aggregiert und diese ausfällt. Diese Bindungsfähigkeit bringt aber auch Vorteile, da Calcium eine sehr hohe Affinität zu carboxylierten Sauerstoff aufweist, das meist verbreitete Motiv in Aminosäuren, und dadurch sehr schnelle Bindungskinetiken erreicht (Case *et al.*, 2007). Um diesen Vorteil zu nutzen, hält die Zelle einen Calciumgradienten von 10.000 über die Plasmamembran aufrecht und somit den höchsten Gradienten in lebenden Zellen (Webb, 2013). Zur Aufrechterhaltung dieses Gradienten muss die Zelle jedoch kontinuierlich Calcium mittels Calcium-ATPasen aktiv aus dem Cytosol pumpen (Sze *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2000). Durch diese Kompartimentierung der Calciumionen bietet sich das Molekül als Botenstoff an, da die zelluläre Konzentration von freiem und komplexierten Calcium sehr präzise über Calciumspeicher sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert werden kann (Jaswail, 2001). In Pflanzen ist Calcium an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt sowie unter biotischen und abiotischen Stress als sekundärer Botenstoff von Bedeutung (Kudla *et al.*, 2010; Dodd *et al.*, 2010). Die intrazelluläre Calciumkonzentration im Cytoplasma liegt im Ruhezustand unter 100 nM, während in endoplasmatischem Retikulum und Vakuole Konzentrationen von 3 μ M bzw. 5 μ M gemessen wurden (Clarkson *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 1989). Durch differenzierte Aktivierung unterschiedlicher Calciumkanäle und ATPasen kann es zu charakteristischen Schwankungen der cytosolischen Calciumkonzentration kommen. Diese Oszillationen der Calciumkonzentration haben eine bestimmte Amplitude, Frequenz und Dauer und werden durch einen Stimulus hervorgerufen (McAinsh *et al.*, 1995). Dieser Stimulus kann mechanisch durch Berührung oder Wind, durch einen Hitzeschock sowie durch sekundäre Botenstoffe wie ROS oder Nod-Faktoren, Faktoren zur Knöllchenbildung, ausgelöst werden (Braam, 2005; Saidi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013a; Shaw und Long, 2003). Dabei wirkt sich die Länge des Stimulus, dessen Konzentration als auch der Zelltyp, in dem der Stimulus wahrgenommen wird, auf die Calciumoszillation aus (Peterson *et al.*, 1999; Marti *et al.*, 2013). Aber nicht nur im Cytosol kann es zu solchen Calciumoszillationen kommen. Auch im Nukleus kommt es zu Ca^{2+} Signaturen die eine autonome Calciumantwort des Zellkerns bewirken (Charpentier und Oldroyd, 2013). Im Cytosol werden die Calciumoszillationen durch calciumbindende Proteine wie Calmodulin, *calmodulin like proteins* (CPIKs) und *calcium-dependent protein kinases* (CPKs) in eine zelluläre Antwort übersetzt (Poovaiah *et al.*, 2013; Bender und Snedden, 2013; Schulz *et al.*, 2013). Diese zelluläre Antwort beeinflusst neben der Entwicklung der Pflanze, wie Wachstum von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren, auch die Symbiose der Wurzelhaare mit Mikroorganismen aber auch Reaktionen auf Stress (Kudla *et al.*, 2010). Eine sehr wichtige Reaktion unter Trockenstress

ist die Kontrolle der Spaltöffnungen der Pflanze durch calciumregulierte Ionenkanäle (Geiger *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass auch der sekundäre Botenstoff ROS Calciumkanäle aktivieren und damit eine Verbindung zur RCAR-ABA Bindung und Regulation der Stomata herstellt (Wang *et al.*, 2013b). Die ebenfalls im ABA-Signalweg involvierten PP2C Proteinphosphatasen sind zur Kontrolle der Calciumspezifität während der Regulation der Stomata von Bedeutung (Brandt *et al.*, 2015). Ein mögliches Drehkreuz zwischen Calciumregulation und ABA-Signalweg stellen die calciumabhängigen Proteinkinasen (CPKs) dar, auf die in nachfolgenden Kapitel genauer eingegangen wird (Schulz *et al.*, 2013).

1.5 Calciumabhängige Proteinkinasen

Um eine Calciumsignatur in eine zelluläre Antwort übersetzen zu können, werden calciumbindende Proteine benötigt. In Höheren Pflanzen, Grünalgen und einigen Einzellern hat sich eine Proteinfamilie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CPKs) entwickelt, die genau dazu in der Lage sind (Harmon *et al.*, 2000; Billker *et al.*, 2004). CPKs sind vermutlich aus einer Genfusion einer Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase mit nachfolgendem Calmodulin-Gen entstanden (Harper *et al.*, 1991; Zhang und Choi, 2001). Durch diese Genfusion wurde aus einem *sensor relay*, bestehend aus der Protein-Protein Interaktion einer Proteinkinase mit einem Calmodulin Protein, ein *sensor responder*, der durch Calciumbindung eine Konformationsänderung erfährt und über eine intramolekulare Interaktion aktiviert wird (Sanders *et al.*, 2002). Die Familie der Arabidopsis CPKs besteht aus 34 Mitgliedern, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in 4 Untergruppen unterteilt werden (Harmon *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002) (Abb. 1.6 A).

1.5.1 Struktur der calciumabhängigen Proteinkinasen

Alle CPK Proteine besitzen eine Struktur aus drei konservierten Domänen (Abb. 1.6 B). Allein der N-Terminus der CPK Proteine ist hoch variabel in Sequenz und Länge und bestimmt dadurch die Substratspezifität sowie Protein-Protein Interaktionen, was anhand von chimären CPK Proteinen nachgewiesen werden konnte (Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2011). Nicht nur die Interaktionen, sondern auch die Lokalisation der CPK Proteine kann durch den N-Terminus bestimmt werden, da sich in einigen CPKs N-terminale Acylierungsstellen zur Myristoylierung und Palmitoylierung befinden, die eine Lokalisation in der Plasmamembran bewirken können (Boudsocq und Sheen, 2013; Martín und Busconi, 2000; Stael *et al.*, 2011). Reversible Palmitoylierung ermöglicht es den Proteinkinasen ihre Lokalisation zwischen den Membranen und dem Cytosol bzw. Nukleus zu ändern (Boudsocq und Sheen, 2013). Auf den N-Terminus folgt die stark konservierte Serin/Threonin Proteinkinase Domäne.

Deren Aktivierung erfolgt in der Regel calciumabhängig, wobei es jedoch auch CPK Proteinkinasen mit basaler Proteinkinaseaktivität gibt (Boudsocq *et al.*, 2012). Neben der spezifischen Serin/Threonin Phosphorylierung dieser Proteinkinasen konnte für CPK4 und CPK34 auch eine Tyrosin Autophosphorylierung nachgewiesen werden (Oh *et al.*, 2012). Die C-terminal anschließende Junction Domäne dient im inaktiven Zustand der Proteinkinase als Pseudosubstrat und führt zur Autoinhibierung (Harper *et al.*, 1994). Diese kann durch die Bindung von Calciumionen an die C-terminale Calmodulin-ähnliche Domäne allerdings aufgehoben werden (Christodoulou *et al.*, 2004). Normalerweise besteht die Calmodulin-ähnliche Domäne aus vier kanonischen EF Hand Motiven, wovon den 34 CPKs der Arabidopsis Familie jedoch neun CPKs nur drei oder weniger funktionelle EF Hände aufweisen (Cheng *et al.*, 2002). Trotzdem kann auch eine CPK mit weniger als 4 kanonischen EF Händen Ca^{2+} binden und dadurch aktiviert werden. Ist allerdings kein kanonisches EF Hand Motiv mehr vorhanden, wie in CPK25, liegt eine konstitutiv aktive Proteinkinase vor, die in der Regulation von Haushaltsgenen beteiligt sein kann (Zhao *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 2011; Boudsocq *et al.*, 2012). Im Allgemeinen besteht jede EF Hand aus einem *loop* von 12 Aminosäuren, die von 2 alpha-Helices flankiert werden, wobei der *loop* die Bindung des Calciumions vermittelt (Zhang und Yuan, 1998). Die Calmodulin-ähnliche Domäne unterteilt sich in zwei funktionelle Untergruppen mit je zwei EF Händen, den sogenannten C- und N- *lobe*, wobei der C-*lobe* eine höhere Affinität zu Calcium aufweist. Man geht davon aus, dass schon im Ruhezustand der Zelle die Bindestellen des C-*lobes* mit Calciumionen besetzt sind (Christodoulou *et al.*, 2004; Harper und Harmon, 2005). Erfährt die Zelle eine Stimulation, durch die die zelluläre Calciumkonzentration steigt, wird auch der N-*lobe* der EF Hand mit Calcium gesättigt und es kommt zu einer Konformationsänderung des Proteins (Wernimont *et al.*, 2010). Während der Konformationsänderung brechen die Helices CH1 und CH2 der Calmodulin-ähnlichen Domäne, sodass sich diese auf die Rückseite der Proteinkinase dreht und das aktive Zentrum zugänglich wird. Für beide Situation, mit und ohne Calcium, wurden Kristallstrukturen der CPK1 aus *Toxoplasma gondii* veröffentlicht (Wernimont *et al.*, 2011; Abb. 1.7). Zur Untersuchung der CPK Proteinkinasen *in vivo* wurden um die Junction- und Calmodulin-ähnliche Domäne verkürzte Versionen der Proteine generiert. Dadurch werden diese verkürzten Proteinkinasen calciumunabhängig und weisen eine konstitutive Aktivität auf (Sheen, 1996; Romeis *et al.*, 2001; Boudsocq *et al.*, 2010). Für den SLAC Ionenkanal konnte so eine Aktivierung durch die verkürzte CPK21 Proteinkinase gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte CPK23 auch in der vollen Länge Version eine schwächere, konstitutive Aktivierung des SLAC Ionenkanals bewirken (Geiger *et al.*, 2010).

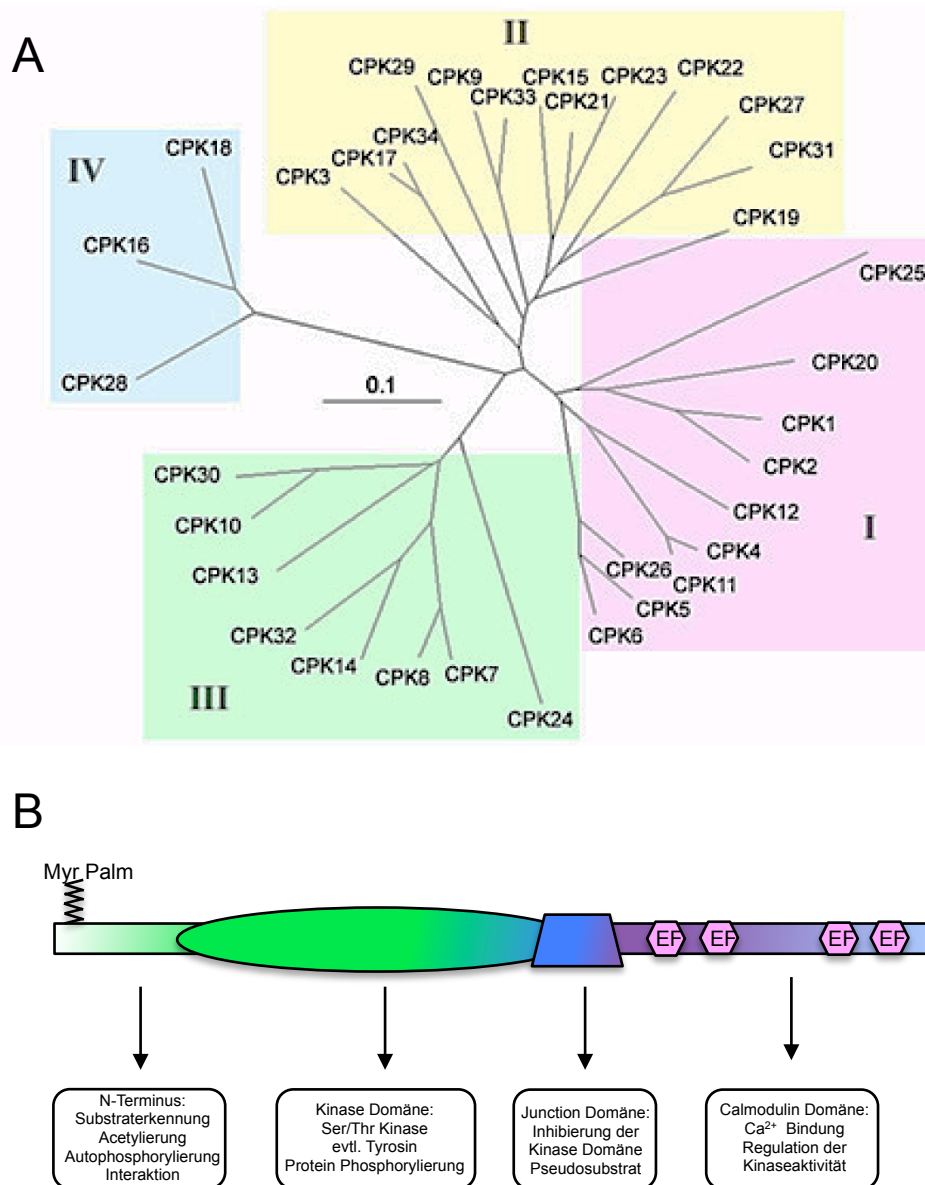


Abb. 1.6 Phylogenetischer Stammbaum der CPK Proteinkinasen sowie CPK Domänenstruktur

In A) ist der phylogenetische Stammbaum der CPK Familie abgebildet. Aufgrund der Sequenzhomologie lassen sich die 34 Mitglieder in 4 Untergruppen einteilen. Der Abstand der Verbindungslinien zueinander entspricht den Unterschieden in der Nukleotidsequenz, wobei der Wert 0,1 einem 10%igen Unterschied entspricht (Abbildung aus Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. und Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein Protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein Protein kinase gene family. *Plant Physiology* 129, 469–485. Abgedruckt mit der Erlaubnis von American Society of Plant Biologists). B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CPK Proteinen. Im N-Terminus einiger CPKs befindet sich eine Acetylierungsstelle, die Einfluss auf die Lokalisation nehmen kann. Zudem ist er zur Substraterkennung und Protein-Interaktion von Bedeutung. Die Proteinkinase Domäne dient der Protein- bzw. Autophosphorylierung von Serinen, Threoninen und in einige Fällen auch Tyrosinen. Im Anschluss befindet sich die Junction Domäne, die als Pseudosubstrat fungieren kann und dadurch die Proteinkinase Domäne blockiert. Zur Aktivierung der Proteinkinase wird eine Ca²⁺ Bindung an die EF Hände der Calmodulin-ähnlichen Domäne benötigt, wodurch eine Konformationsänderung ausgelöst wird, die das aktive Zentrum der Proteinkinase freigibt.

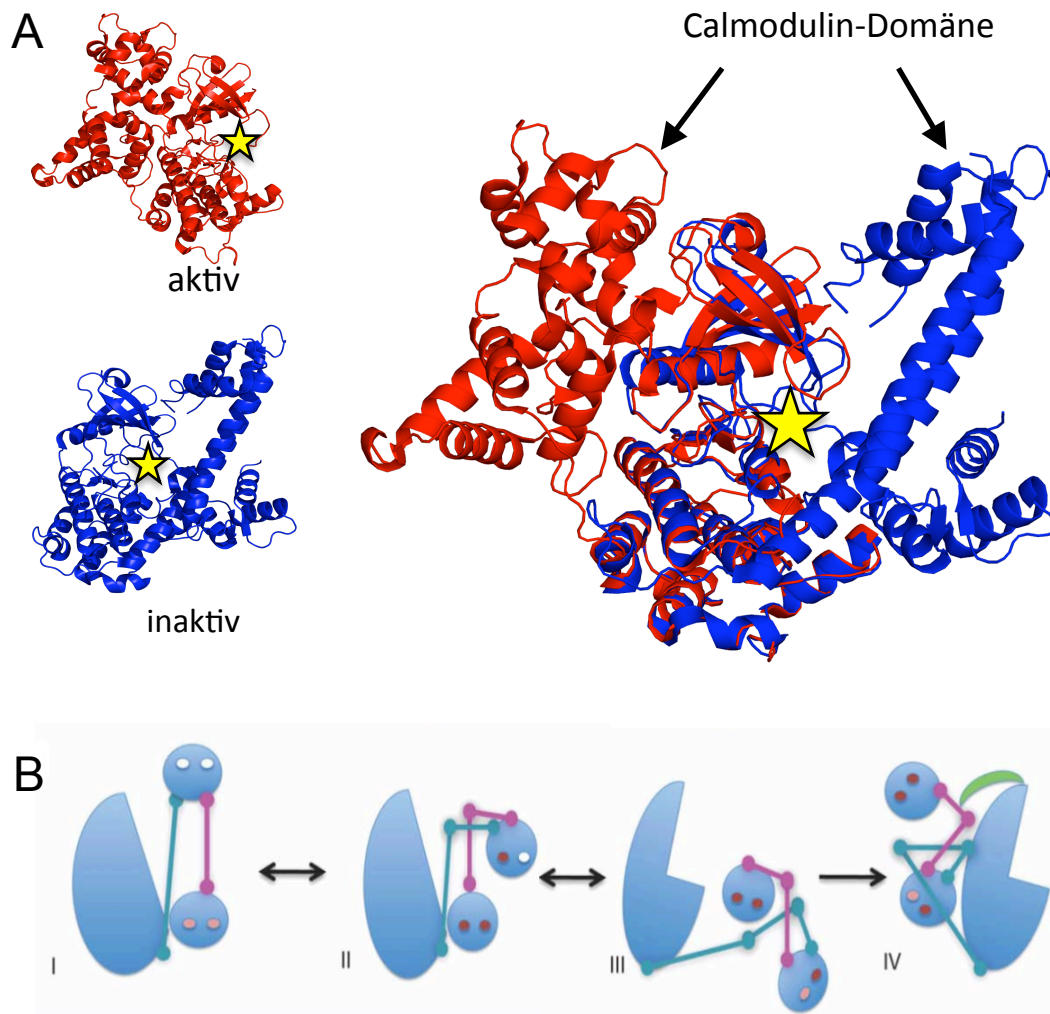


Abb. 1.7 Konformationsänderung der CPKs aufgrund der Ca^{2+} Bindung der Calmodulin-ähnlichen Domäne

A) 3D Struktur der CPK1 aus *Toxoplasma gondii*. Auf der linken Seite sind die Konformationen im aktiven Zustand (rot; pdb: 3HX4) und inaktivem Zustand (blau; pdb: 3KU2) dargestellt. Das aktive Zentrum der Proteinkinase wurde als gelber Stern gekennzeichnet. Rechts daneben wurden beide Strukturen überlagert, um die deutliche, durch Calciumbindung hervorgerufene Konformationsänderung zu veranschaulichen. In Abbildung B) ist die Calciumbindung in Form eines Schemas dargestellt. Gesättigte EF Hände sind als braune Kreise dargestellt. Im Ruhezustand der Zelle wurde der C-lobe bereits von Calcium gebunden. Findet eine Erhöhung der Calciumkonzentration statt, binden auch die EF Hände des N-lobes Calcium, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, indem die Helices CH1 (türkis) und CH2 (pink) brechen, und das aktive Zentrum freigeben. Die Struktur wurde mittels MacPyMOL erstellt (Abbildung aus Wernimont, A.K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J.C., Artz, J.D., Lin, Y.H. *et al.* (2011). Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins* 79, 803–820. Abgedruckt mit der Erlaubnis von John Wiley and Sons).

1.5.2 Funktion der calciumabhängigen Proteinkinasen

Generell wurden für die CPK Familie zum Teil sehr spezialisierte, aber auch wieder überlappende Expressionsmuster gezeigt. So weist die ganze Familie unterschiedliche subzelluläre Lokalisation, verschiedene Substratspezifität sowie differente Calciumsensitivität auf. Es konnte eine Aktivierung als auch Repression von Enzymen, Ionenkanälen und auch Transkriptionsfaktoren detektiert werden. Mit diesen facettenreichen Fähigkeiten sind CPK Proteine in der Immun- und Stressantwort, in der

Regulation der Stomata, des Hormonhaushaltes sowie in der Genexpression involviert (Boudsocq und Sheen, 2013; Schulz *et al.*, 2013; Abb. 1.8). Dabei interagieren die Proteinkinasen nicht linear, sondern können interaktiv an mehreren Signalwegen mitwirken oder, *vice versa*, regulieren oft mehrere Proteinkinasen ein und denselben Signalweg, wie im Fall der Immunantwort bei Pathogenbefall. Dort steuern gleich sechs calciumabhängige Proteinkinasen CPK1, CPK2, CPK4, CPK5, CPK6 und CPK11 die Reaktion der Zelle durch ROS Produktion, Umstellung der Genexpression bis hin zum programmierten Zelltod (Boudsocq *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013). Schon allein die Aktivierung von CPK5 und CPK6 kann zu einem ROS-vermittelten Zelltod führen (Boudsocq *et al.*, 2010; Dubliella *et al.*, 2013). CPK6 ist parallel zu dieser Funktion auch in der ABA-abhängigen Regulation der Stomata involviert, wo es den Anionenkanal SLAC1 phosphorylieren und dadurch aktivieren kann (Mori *et al.*, 2006; Brandt *et al.*, 2012). Ein weiteres Beispiel der Überschneidung von Signalwegen findet durch die Proteinkinase CPK11 statt. In Kombination mit CPK24 ist diese Proteinkinase als negativer Regulator des Pollenschlauchwachstums identifiziert worden (Zhao *et al.*, 2013). Dabei weisen beide Proteinkinasen unterschiedliche Calciumaffinitäten auf. Während die Aktivität von CPK11 stark durch Calcium induziert werden kann, ist CPK24 calciumunabhängig konstitutiv aktiv. Zur Regulation des Pollenschlauchwachstums wird durch Ca^{2+} Ionen CPK11 aktiviert, das den N-Terminus von CPK24 phosphorylieren kann. Durch diese Phosphorylierungskaskade kann CPK24 spezifisch Substrate wie K^+ Kanäle inhibieren (Zhao *et al.*, 2013; Schulz *et al.*, 2013). Ebenfalls in der Pollenschlauchregulation involviert, kontrollieren die Proteinkinasen CPK17 und CPK34 sowohl das Wachstum als auch die Fitness des Pollenschlauchs (Myers *et al.*, 2009). Eine weitere Funktion leistet CPK11 im Zusammenspiel mit CPK4 in der ABA-Signaltransduktion. Mutanten dieser Proteinkinasen weisen einen ABA-insensitiven Phänotyp in Keimung, Stomataregulation und Salztoleranz auf. Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion wird sowohl durch die Phosphorylierung der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren ABF1 und ABF4 genommen als auch über die direkte Interaktion zwischen CPK11 und den Proteinphosphatasen des ABA-Signalwegs (Zhu *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2012). Ebenfalls eine Interaktion zwischen einer Phosphatase des ABA-Signalwegs mit einer CPK Proteinkinase konnte für ABI2 und CPK12, ein negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion, nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2011). Neben diesen Proteinkinasen sind aber noch weitere CPKs wie CPK10, CPK21, CPK23 und CPK32 im ABA-Signalweg involviert (Zou *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2011; Ma und Wu, 2007; Choi *et al.*, 2005). Für konstitutiv aktive Versionen von CPK10 und CPK30 wurde im transienten Expressionssystem in Maisprotoplasten eine positive Regulation der Expression von Genen der ABA-Stressantwort beobachtet (Sheen, 1996). Zu einer ABA-abhängigen Schließung der Stomata kommt es, wenn die homologen calciumabhängigen Proteinkinasen CPK21 und CPK23 den SLAC Anionenkanal der Schließzellen phosphorylieren und damit aktivieren. Eine identische Reaktion kann durch die Phosphorylierung mittels der calciumunabhängigen Proteinkinase OST1

hervorgerufen werden (Mori *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2010). Analysen einer *cpk5/6/11/23 knockout* Mutante in Brandt *et al.* (2015) konnten nachweisen, dass es in dieser Mutante zu keiner Aktivierung des SLAC Anionenkanals kommt und somit auch nicht zur Schließung der Stomata. Im Gegensatz dazu wurde anhand einer *knockout* Mutante der PP2C Proteinphosphatasen ABI1/ABI2/PP2CA/HAB1 eine calciumabhängige Aktivierung des SLAC Anionenkanals detektiert, allerdings unabhängig von ABA (Brandt *et al.*, 2015). Dieser Auszug diverser Funktionen einiger Mitglieder der CPK Familie verdeutlichen die Komplexität und Feinheiten der Regulations-mechanismen in Pflanzen. Besonderes Augenmerk wird in nachfolgendem Kapitel auf die Proteinkinase CPK23 geworfen, da ihre genaue Funktion in der ABA-Signaltransduktion noch unklar ist.

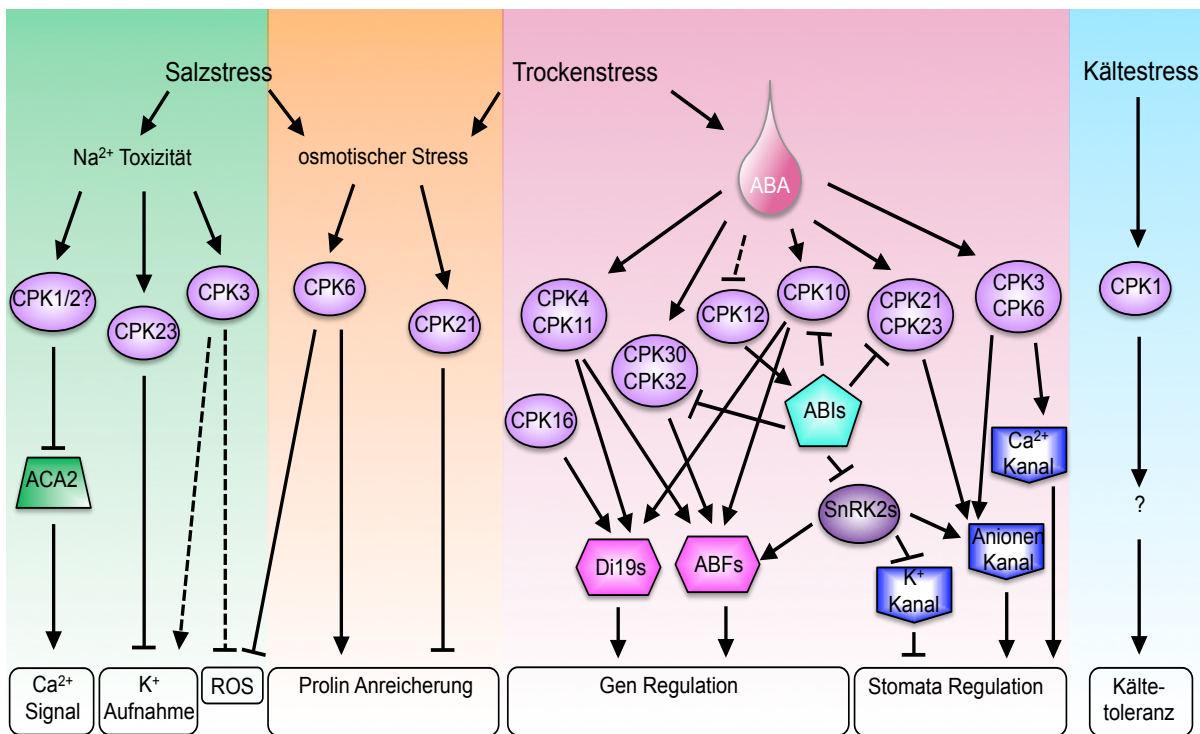


Abb. 1.8 CPK Interaktionen als Antwort auf abiotischen Stress

Abiotischer Stress, wie Salz und Dürre, führt in der Pflanzenzelle zu Na²⁺ Toxizität, osmotischen Stress sowie zur ABA-Synthese. Alle drei Faktoren aktivieren bestimmte CPK Proteine (violette Ellipsen), woraufhin unterschiedliche Reaktionen wie Ca²⁺ Signale, K⁺ Aufnahme, ROS-Produktion, Prolin-Anreicherung als auch Stomata- und Genregulation eine Salz- und Trockentoleranz bewirken. Im ABA-Signalweg aktivieren CPK Proteine Transkriptionsfaktoren wie ABFs und Di19s (pinke Rechtecke). Diese können auch durch SnRK2 Proteinkinasen (dunkelviolette Ellipse) aktiviert werden. Ebenfalls von beiden, CPK und SnRK2, angesprochen werden die Ionenkanäle (blaue Rechtecke) zur Regulation der Stomata. Bis auf CPK12 wird eine Vielzahl an CPK Proteinkinasen sowie SnRK2 von den ABI Proteinphosphatasen (türkises Rechteck) des ABA-Signalwegs inhibiert und dadurch Einfluss auf die Genregulation sowie Stomataregulation genommen. Eine Regulation bei Kältestress konnte ebenfalls durch CPK1 nachgewiesen werden, wobei der genaue Mechanismus jedoch noch unklar ist (verändert nach Boudsocq, M. und Shenn, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. Trends In Plant Science 18, 30-40. Abgedruckt mit der Erlaubnis von Elsevier).

1.6 Funktion der CPK23 Proteinkinase

Eine calciumabhängige Proteinkinase, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist, ist CPK23. Wie bereits oben erwähnt wurde, ist CPK23 ein Aktivator des SLAC Anionenkanals und damit in der ABA-abhängigen Regulation der Stomata beteiligt (Geiger *et al.*, 2009). Zur Vereinfachung wird im Folgenden CPK23 aus dem Landsberg Ökotyp mit CPK23L und CPK23 aus dem Columbia Ökotyp mit CPK23C verwendet. Erste Hinweise, dass dieses Gen in der ABA-abhängigen Stressantwort involviert ist, ergaben sich aus der Untersuchung einer *Landsberg erecta* EMS Mutante mit einer 5' UTR Punktmutation im CPK23L Gen. Diese Mutante wurde als *growth control exerted by ABA2 (gca2)* entdeckt, da sie ein ABA-insensitives Verhalten auf Wurzelwachstum, Stomataregulation und Keimungsverhalten aufwies und damit phänotypische Ähnlichkeiten zu *abi1* und *abi2* erkennen ließ (Iten, 1992; Korte, 2009; Himmelbach *et al.*, 1998). In darauf folgenden Analysen wurde bestätigt, dass *gca2* an der Aktivierung von Calciumkanälen durch H₂O₂ beteiligt ist und damit ein insensitives Verhalten der Schließzellen sowohl gegenüber H₂O₂ als auch gegenüber ABA bewirkt (Pei *et al.*, 2000). Dieses insensitive Verhalten der Schließzellen konnte auch in der Regulation von CO₂ beobachtet werden. Normalerweise führen erhöhte CO₂ Konzentrationen zu einer Veränderung der cytosolischen Ca²⁺ Signatur und damit zur Schließung der Stomata. In der *gca2-1* Mutante konnte dies jedoch nicht beobachtet werden (Young *et al.*, 2006). Generell zeigen Schließzellen eine bestimmte, durch Calcium und ABA-induzierbare Ca²⁺ Signatur, die durch Frequenz, Amplitude und Dauer beschrieben werden kann und für die Schließung der Stomata verantwortlich ist (Allen *et al.*, 2000). Sowohl die ABA-induzierte als auch die calciuminduzierte Veränderung der Ca²⁺ Signatur weicht in der *gca2-1* Mutante deutlich vom Wildtyp ab, indem einerseits die Frequenz der Calciumsignale erhöht wurde während andererseits die Dauer reduziert wurde (Allen *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte bei Untersuchungen einer *cpk23c knockout* Mutante ein Einfluss dieses Gens auf die Genexpression einer anderen CPK beschrieben werden. Geiger *et al.* (2009) konnten zeigen, dass in der *cpk23c knockout* Pflanze die Expression der CPK11 Proteinkinase in Schließzellen um 40% reduziert ist, welche normalerweise durch Salz- und Trockenstress induzierte Expressionswerte aufweist (Geiger *et al.*, 2009; Urao *et al.*, 1994). Die Beteiligung von CPK23C an Salz- und Trockenstress konnte bereits sowohl durch Untersuchung einer Überexpressionslinie, welche erhöhte Stresssensitivität, als auch einer *cpk23c knockout* Linie, welche erhöhte Salz- und Trockentoleranz zeigte, nachgewiesen werden (Ma und Wu, 2007). Zusammengefasst geben die erhaltenen Ergebnisse kein eindeutiges Bild der Funktion der CPK23 Proteinkinase. Während *knockout* Mutanten von CPK4, CPK11 und CPK23C zu einem ABA-insensitiven Phänotypen führen (Zhu *et al.*, 2007; Ma und Wu 2007), wurde in Korte (2009) gezeigt, dass eine Überexpression von CPK23L für den in *gca2* ABA-insensitiven Phänotyp verantwortlich ist. Um diese Kontroverse aufzuklären, werden in dieser Arbeit die CPK23 Proteine beider Ökotypen auf deren Regulation und Genexpression untersucht.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der Bewältigung von Salz-, Kälte- und Trockenstress ist das Phytohormon Abscisinsäure von größter Bedeutung. Sein Regulationsmechanismus wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und verschiedene Mitglieder der CPK Familie als positive sowie negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion identifiziert. Oft sind aber nicht nur einzelne Proteine in dieser Regulation beteiligt, vielmehr gilt es das komplexe Netzwerk und Interaktom dieser Signaltransduktion zu entschlüsseln. Neben der calciumabhängigen Proteinkinase CPK23 ist auch CPK21 und die SnRK2 Proteinkinase OST1 in der ABA-abhängigen Regulation der Stomata beteiligt. Dabei ist die genaue Rollenverteilung der Proteinkinasen untereinander sowie der Einfluss der Proteinkinasen auf die ABA-abhängige Genexpression noch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der calciumabhängigen Proteinkinasen CPK23 aus den Ökotypen Landsberg und Columbia in Bezug auf ihre Aktivierung durch Calcium im Vergleich zur CPK21 Proteinkinase. Des Weiteren sollen die am ABA-Signalweg beteiligten Komponenten des RCAR/PP2C-Komplexes sowie die ABF Transkriptionsfaktoren auf Phosphorylierung durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 analysiert werden. Mögliche Phosphorylierungsstellen können daraufhin auf ihren Einfluss auf die ABA-abhängige Genregulation im transienten Expressionssystem untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Geräte

Wenn nicht anders vermerkt wurden die in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) und AppliChem (Darmstadt) bezogen. Die zur Laborarbeit verwendeten Geräte sind folgend tabellarisch aufgelistet.

Methode/Kategorie	Gerät/Modell	Hersteller
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200N, P1000N, P5000	Gilson
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckman Coulter
	Typ 5415 R	Eppendorf
	Typ 5424	Eppendorf
	Universal 16	Hettich
	Rotina 420 R	Hettich
SDS-PAGE/Western Blot:	Gelelektrophorese-Netzteil EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
	PerfectBlue Doppel-Gelsystem Twin ExW S	Peqlab
	SDS-Kammer Mini-PROTEAN [®] Tetra System	BioRad
	Trans-Blot [®] Semi Dry Transfer Cell	BioRad
	CCD-Camera: ImageQuant LAS 4.000 mini	GE Healthcare
	Ultraschall Sonopuls HD2070	Bandelin
	Mikrowelle MC-9287UR	LG
Proteinkinase-Aktivitätstest	Vakuum Geltrockner Drygel SR Mod 1160	Hoefer Scientific
	Phosphor-Imager BAS 1800	Fujifilm
	BAS Phosphor Platte	Fujifilm
	BAS Cassetten 2025	Fujifilm
	Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR	Packard
Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
	Ultrospec [®] 2000	Pharmacia Biotech

MATERIAL UND METHODEN

MicroCal® iTC ₂₀₀ System	MicroCal® iTC ₂₀₀ MicroCalorimeter	GE Healthcare
	MicroCal® iTC ₂₀₀ washing module	GE Healthcare
Protoplasten	Luminometer Flash'n Glow	Berthold
	Luminometer Plate CHAMELEON™V	Hidex
	Mikroplattenleser Synergy 2	BioTek
	Kippschüttler RotoShake Genie	Scientific Industries
Klonierung	PCR-Thermocycler T-Gradient	Biometra
	Wasserbad	Julabo
	Brutschrank ED53	WTB Binder
	Thermoshaker	Gerhardt
	Sterilbank Laminar Flow Workstation	Microflow
Geldoc UV- System	Reprostar 3	Camag
	P91D / P93D	Mitsubishi
	UV 312nm	Bachofer
	Doc-It	UVP
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
	Vacuum Concentrator	Bachofer
Weitere Instrumente	Feinwaage BP110S	Sartorius
	Laborwaage BP3100S	Sartorius
	Magnetrührer HSC	Velp Scientifica
	Vortexer MS 3 basic	IKA
	pH-Meter pH 526	WTW
	Thermomixer 5436	Eppendorf

2.2 Verwendete Bakterienstämme und ihre Medien

2.2.1 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Resistenz	Quelle
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ-	---	Invitrogen (Karlsruhe)
M15 pREP4	F ⁻ , Φ80ΔlacM15, thi, lac ⁻ , mtl ⁻ , recA ⁺ , Km ^R	Kanamycin	Quiagen (Hilden)
XL1 blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Tetracyclin	Stratagene (Heidelberg)
Rosetta(DE3) pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (R _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam ^R)	Chloramphenicol	Novagen/Merck (Darmstadt)

2.2.2 Nährmedium und Antibiotika

Die verwendeten Bakterienstämme wurden in LB-Medium bei 37°C, 200 rpm angezogen. Zur Selektion wurden dem Stamm und Plasmid entsprechende Antibiotika zugesetzt.

LB Medium: 0,5% Hefeextrakt
1% Trypton
1% NaCl
1,6% Agar (für Festmedium)
pH 7,0 eingestellt mittels NaOH

Antibiotika: Ampicillin 100 µg/ml Endkonzentration
Kanamycin 50 µg/ml Endkonzentration
Chloramphenicol 64 µg/ml Endkonzentration (gelöst in EtOH)

MATERIAL UND METHODEN

PCR-Reaktionsansatz:	1 µl	DNA Templat
	2 µl	10 x PCR-Puffer
	2 µl	10 x dNTP-Mix
	0,5 µl	Forward Primer (10 µM)
	0,5 µl	Reverse Primer (10 µM)
	ad 20 µl	MQ

Um sicherzustellen, dass während der PCR Amplifikation keine Fehler in den DNA Strang eingebaut werden, wurde die Phusion Polymerase der Firma Thermo Scientific mit *proof-reading* Funktion verwendet. Das PCR Programm bezieht sich auf die Angaben des Herstellers, wurde aber durch jeweilige Annealing-Temperatur des Primers sowie Länge der Nukleotidsequenz abgewandelt. Die verwendeten Primer wurden von Metabion (Martinsried), Sigma-Aldrich (Seelze) und MWG Eurofins (Ebersberg) synthetisiert.

PCR Programm:	Initiierung:	98°C 30'' Hitzedenaturierung
	DNA-Amplifikation:	98°C 10'' Hitzedenaturierung
		55-65°C 30'' Annealing
		72°C DNA 1' - 4' Synthese
		Wiederholung des Zyklus 26-34 mal
	Endsynthese:	72°C 5' Synthese
		22°C ∞

2.3.3 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung bzw. Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. In dieser PCR wurde das Templat direkt aus einer Bakterienkolonie verwendet, indem diese mittels einer sterilen Spitze gepickt und in den PCR Ansatz inokuliert sowie anschließend auf einer Repikaplatte ausgestrichen wurde. Da das durch PCR erhaltene DNA-Fragment nur zur Kontrolle diente und keine weitere Verwendung hatte, wurde für die Kolonie-PCR ein GoTaq Polymerase (Promega) ohne *proof-reading* Funktion verwendet.

PCR-Reaktionsansatz:	2 µl	10 x PCR-Puffer
	2 µl	10 x dNTP-Mix
	0,5 µl	Forward Primer (10 µM)
	0,5 µl	Reverse Primer (10 µM)
	ad 20 µl	MQ

PCR Programm:	Initiierung:	95°C 5' Hitzedenaturierung
	DNA-Ampifikation:	95°C 30'' Hitzedenaturierung
		55-65°C 30'' Annealing
		72°C DNA 1' Synthese
		Wiederholung des Zyklus 26-34 mal
Endsynthese:	72°C 5' Synthese	
	22°C ∞	

Das erhaltene PCR Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.3.4 Klonierungsstrategien: Restriktionsverdau, Dephosphorylierung, zielgerichtete Mutagenese, Ligation und Transformation

2.3.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Um mittels PCR synthetisierte Nukleotidsequenzen an einen bestimmten Locus eines Plasmids zu klonieren, müssen beide DNA Fragmente mit einem Restriktionsenzym verdaut werden. Dazu wurden Restriktionsendonukleasen von MBI- Fermentas (St. Leon-Rot) sowie von New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) verwendet. Der Verdau erfolgte mit den entsprechenden Restriktionspuffern für 2h bei 37°C. Zur Überprüfung der Restriktion wurde eine Aliquot des Ansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.3.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Neben den PCR Produkten wurden auch die entsprechenden Vektoren mittels Endonukleasen geschnitten. Um zu verhindern dass diese spontan religieren, wurde der 5'-Phosphorylrest mittels alkalischer Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase) abgespalten. Dazu wurde zu je µg DNA ein µg alkalische Phosphatase eingesetzt und der Ansatz 1h bei 37°C inkubiert. Um im Anschluss die Phosphatase zu deaktivieren, wurde der Ansatz für 10 min in einen 65°C-Heizblock gestellt.

2.3.3.3 Ligation von DNA

Die Ligation des Vektors und Inserts erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einer T4 DNA-Ligase der Firma Thermo Scientific. Um einen Erfolg zu gewährleisten, wurde ein 1 : 3 Verhältnis zwischen Vektor zu Insert in dem Ansatz verwendet, der bei 22°C für eine Stunde bzw. bei 4°C über Nacht inkubiert wurde.

2.3.3.4 Zielgerichtete Mutagenese

Während einer zielgerichtete Mutagenese bzw. *site directed mutagenesis* (SDM) können gerichtet einzelne Basen im Plasmid-Rückgrat mit Hilfe von speziell entworfenen Primern während einer PCR ausgetauscht werden (Zheng *et al.*, 2004). Dies führt zu einer Veränderung der DNA Sequenz und damit auch zu einer abgeänderten Aminosäuresequenz im Protein. Dafür wurde 50 ng eines DNA Templats mit je 250 nM des entworfenen Vorwärt- und Rückwärtsprimers in einen 100 µl PCR Ansatz eingesetzt. Um Lesefehler während der PCR zu vermeiden, wurde die *proof-reading* Polymerase Phusion (Thermo Scientific) verwendet und eine Synthesedauer von 4 min gewählt. Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI 2h bei 37°C inkubiert, wodurch das Ausgangsplasmid spezifisch verdaut wurde. Im Anschluss wurden 5 µl des Ansatzes zur Transformation in *E.coli* verwendet.

2.3.3.5 Transformation von DNA

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* Zellen wurden chemisch-kompetente Zellen verwendet, welche bei -80°C gelagert wurden. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 80 µl Zellen mit einem µl der zu transformierenden DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 75'' im Wasserbad, woraufhin die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Nach 5 Minuten wurden die Zellen mit 400 µl LB Medium vermischt und eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht in den 37°C-Brutschrank gestellt.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Aufreinigung von PCR Produkten wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Diese eignet sich zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe. Dazu wurde zwischen 1% (w/v) und 2% (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer durch Erhitzen aufgelöst. Die flüssige Agarose wurde anschließend mit Ethidiumbromid (0,05 µl/ml Gel) versetzt und in eine Gelform gegossen. Nach 10 Minuten war das Gel erstarrt und wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer, gefüllt mit 1x TAE Puffer, gegeben. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (10x) versetzt und neben einen DNA-Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 200V für 30 min wurden die DNA-Banden durch Anregung des Ethidiumbromids mittels UV-Licht sichtbar und fotografiert.

50 x TAE-Puffer:	242 g/l Tris Base
	57,1 ml 98% Essigsäure
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

10 x DNA-Ladepuffer: 60% Glycerin
 100 mM EDTA pH 8,0
 0,25% Farbindikator Orange G

2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurde, wie oben beschrieben, eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Jedoch wurde nicht ein Aliquot, sondern der gesamte präparative Ansatz auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels des Invisorb Spin DNA Extraction Kits (Strattec molecular) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.4 Arbeiten mit Protoplasten

2.4.1 Protoplastenpräparation

Zur Präparation von Mesophyll-Protoplasten wurden etwa 2g Blattmaterial von drei bis vier Wochen alten Arabidopsis Keimlingen verwendet und diese in 15 ml Enzymlösung rund 3 Stunden verdaut. Im Anschluss wurden die Protoplasten von den Blattüberresten durch Filtration über ein 200 µM Nylonnetz getrennt und dieses mit 10 ml W5 Lösung nachgespült. Die so verdünnten Protoplasten wurden durch Zentrifugation für 2 min 60 g mit minimaler Beschleunigung sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Protoplasten in 10 ml W5 aufgenommen. Während einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis setzten sich die Protoplasten ab, wodurch der Überstand vorsichtig abgenommen werden konnte. Die zurückgebliebenen Protoplasten wurden, je nach Größe des Pellets, in 3-5 ml MM-Lösung aufgenommen und deren Konzentration am UV-Spektrometer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot 1 : 20 in 80%igen Ethanol verdünnt und die Absorption des Chlorophylls bei 652 nm und 720 nm gemessen. Entsprechend der Differenz dieser Werte der Absorption von 1,8, waren $1 \cdot 10^6$ Protoplasten in einem ml Lösung. Diese Konzentration an Protoplasten wurde für die nachfolgende Transfektion verwendet.

Enzymlösung: 1% Cellulase (Yakult, Japan)
 0,25% Macerozyme (Yakult, Japan)
 400 mM Mannitol
 8 mM CaCl₂
 0,6% BSA
 5 mM MES/KOH pH 5.6
 ~2,5 nM AEBSF (nach Dialyse)

W5 Lösung: 2 mM MES/KOH pH 5.7
 154 mM NaCl
 125 mM CaCl₂
 5 mM KCl
 steril filtriert

MM Lösung: 5 mM MES/KOH pH 5.7
 400 mM Mannitol
 15 mM MgCl₂
 steril filtriert

2.4.2 Protoplastentransfektion

Bevor die Protoplasten transfiziert wurden, wurde ein Master-Mix, bestehend aus 9 µg LUC Reporterkonstrukt, 3 µg GUS als internen Standard und unterschiedlicher Effektor-DNA, vorbereitet. Um bei jeder Transfektion die gleiche DNA Menge, minimal 15 µg bis maximal 45 µg DNA, einzusetzen, wurde, falls nötig, mit Leervektor aufgefüllt. Die Ansätze wurden mit MQ auf 15 µl aufgefüllt, mit gleichem Volumen 0,8 M Mannitol versetzt und in ein 2 ml Eppendorf Tube überführt. Im Anschluss wurden 100 µl der frisch vorbereiteten Protoplasten hinzupipettiert und die Transfektion mittels 180 µl 37°C warmer PEG-Lösung gestartet. Nach Zugabe der viskosen PEG-Lösung wurde das Tube mehrmals invertiert und der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Um die Transfektion zu stoppen wurden 750 µl W5 Lösung zugegeben, kurz invertiert und die Protoplasten 2 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 220 µl WIMK Lösung gelöst. Zur Analyse der ABA-abhängigen Induktion wurde der Ansatz geteilt und jeweils eine Hälfte mit WIMK, die andere Hälfte mit 3 µM ABA (verdünnt in WIMK) induziert. Nach einer Inkubationszeit von 6 – 16 Stunden unter Dauerlicht bei 22°C wurde die Luciferase Aktivität der Protoplasten gemessen.

PEG-Lösung: 40% PEG 4000
 200 mM Mannitol
 100 mM CaCl₂
 frisch hergestellt

WIMK: 4 mM MES/KOH pH 5.7
 500 mM Mannitol
 20 mM KCl
 steril filtriert

2.4.3 Enzymatische Messungen in Protoplasten

Die durch die Effektoren hervorgerufene Gen-Regulation wurde am Luminometer Plate CHAMELEON™V (Hidex) mittels *Photinus pyralis* Luciferase bestimmt, während die Transfektionseffizienz, gemessen an dem internen Standard der bakteriellen β -D-Glucuronidase (GUS), am Mikroplattenleser Synergy 2 (BioTek) ausgelesen wurde. Dazu wurden die bereits inkubierten Protoplasten gleichmäßig aufgeteilt und zeitgleich an beiden Geräten gemessen. Zur Messung der Luciferase Aktivität wurden 50 μ l des Transfektionsansatzes in eine weiße Microtiterplatte überführt und im Luminometer analysiert. Dazu wurde 10 Sekunden der Hintergrund gemessen, anschließend 100 μ l LAR injiziert und weitere 20 Sekunden detektiert (Luehrsen *et al.*, 1992). Die Bestimmung der GUS-Werte erfolgte am Microplate Reader, indem 50 μ l des Transfektionsansatzes in schwarze Microtiterplatten pipettiert und mit 100 μ l GUS-Reagenz versetzt wurden. Gemessen wurde die Fluoreszenz bei einer Anregung von 365 nm und Emission von 460 nm bei 37°C für 10 Minuten. Aus den gemessenen Werten wurde die Steigung bestimmt und diese zur weiteren Auswertung verwendet. So wurden die erhaltenen Lumineszenz Werte durch die entsprechenden GUS-Werte geteilt und die daraus entstandenen Induktionswerte in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

Luciferase Assay Reagent (LAR): 20 mM Tricine/NaOH pH 7.8
 2,7 mM MgSO₄
 0,5 mM EDTA
 33,3 mM DTT
 0,53 mM ATP
 520 mg/l Magnesiumcarbonat
 200 mg/l Coenzyme A
 150 mg/l Luciferin
 0,1% Triton X-100

GUS-Reagenz: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0
 10 mM EDTA
 1 mM DTT
 0,1% Triton X-100
 0,5 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Anzucht von Bakterien

Zur Proteinreinigung wurde eine Einzelkolonie einer frisch transformierten Platte in 50 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Diese Übernachtskultur (ÜNK) diente zum Animpfen der anschließenden Übertagkultur (ÜTK). Dazu wurde 400 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, mit der ÜNK auf eine oD_{600} von 0,1 eingestellt und bei 37°C, 200 rpm im Schüttler inkubiert. Bei einer oD_{600} von 0,4 wurden die Zellen, falls nötig, in einen vorgekühlten Schüttler umgestellt und bei einer oD_{600} von 0,6 mit 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid) induziert. Die Expression der Proteine erfolgt unter folgenden Bedingungen:

CPK:	8h	22°C
RCAR:	4h	37°C
PP2C:	2h	37°C
OST1:	3h	37°C
ABFs:	4h	28°C

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 min bei 4°C und 4.000g zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder gleich weiter verwendet oder bis zum Zellaufschluß bei -20°C gelagert.

2.5.2 Proteinreinigung

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte im Fall von CPKs, RCARs, PP2Cs und OST1 über einen 6x Histidin-tags am C-Terminus der Proteine mit Hilfe eines Protino® Nickel-TED 2000-Säulen Kits der Firma Macherey & Nagel. Diese Proteinreinigung beruht auf dem Prinzip der Immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), wobei die Stickstoffatome der Histidin-Seitenketten mit den Nickelionen des Säulensubstrates interagieren. Dadurch wird eine spezifische Anreicherung des rekombinant exprimierten Proteins erreicht.

LEW-Puffer: 50 mM NaH_2PO_4
 300 mM NaCl
 pH = 8,0 eingestellt mit NaOH

Elutionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol
 pH = 8,0 eingestellt mit NaOH

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

2.5.2.1 Aufschluss der Zellen

Zur Weiterverarbeitung des Zellpellets wurde dieses, falls nötig, auf Eis aufgetaut und mit gleichem Volumen an 1x LEW Puffer versetzt. Nach Zugabe von Lysozym (1 mg/ml Endkonzentration) wurden die Zellen durch Vortexen homogenisiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Lysozym wurden die Zellwände der Bakterien leicht anverdaut, sodass die Effizienz des danach folgenden Ultraschall-Aufschlusses erhöht wurde. Dazu wurden die Zellen 35'' lang mit 90% Power und 9 Zyklen sonifiziert (Ultraschall Sonopuls HD2070, Bandolin). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei die Zellen zwischen den Wiederholungen mindestens eine Minute auf Eis inkubierten. Um das Zellextrakt von den Zelltrümmern zu trennen, wurde das Lysat 15 min bei 50.000 g und 4°C abzentrifugiert.

2.5.2.2 Aufreinigung mittels HIS-tag

Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde auf die mit 4 ml LEW Puffer äquilibrierten Protino-Säulen aufgetragen. Nach Durchlauf des gesamten Zellextrakts wurden die Säulen viermal mit je 4 ml 1x LEW Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteinverunreinigungen zu entfernen. Im Anschluss wurde das mittels HIS-tag gebundene Protein durch Zugabe von 2 x 2 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert.

2.5.2.3 Aufreinigung mittels GST-tag

GST fusionierte Proteine wurden auch über diesen Anhang gereinigt. Dabei erfolgten die Zellanzucht sowie der Zellaufschluss wie oben beschrieben. Der aus der Zentrifugation hervorgehende Zellextrakt wurde mit 400 µl Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) *beads* bei 4°C für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation von 30'' bei 60 g wurde der Überstand verworfen und die Glutathione Sepharose viermal mit je 10 ml 1x LEW Puffer gewaschen. Zur Elution des Proteins von den *beads* wurden diese mit 1 ml 10 mM reduzierten Glutathion in 1x LEW Puffer für 5' inkubiert und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt und das daraus gewonnene Protein anschließend gegen Dialyse Puffer dialysiert.

2.5.2.4 Aufreinigung mittels Strep-tag

Die Aufreinigung mittels *Strep-tag* erfolgte anhand von Strep-Tactin Sepharose *beads* (IBA). Die Zellanzucht sowie der Zellaufschluss wurden wie oben beschrieben durchgeführt und das daraus hervorgehende Zellextrakt mit 400 µl der Strep-Tactin Sepharose Suspension für eine Stunde bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30'' bei 60 g wurde der Überstand verworfen und die Strep-Tactin Sepharose *beads* viermal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss folgte die Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin, gelöst in Waschpuffer. Dazu wurde in 4 Schritten je 1 ml Elutionspuffer für 5' auf den *beads* inkubiert und der entstandene Überstand abgenommen. Das darin enthaltene Protein wurde gegen den entsprechenden Puffer dialysiert.

Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl

2.5.2.5 Dialyse

Zur Entfernung des im Elutionspuffer enthaltenen Imidazols, Glutathions bzw. Desthiobiotins wurden die Elutionsfraktionen in speziell am Lehrstuhl hergestellten Dialysekammern gegen 400 ml Puffer dialysiert. Dazu wurde die Elutionsfraktionen mit dem Proteaseinhibitor AEBSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt und unter Verwendung von Membranen mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 14 kD (VISKING® dialysis tubing 36/32, Durchmesser 27 mm, Serva) unter Rühren bei 4°C im Kühlraum dialysiert.

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

SnRKs/ABFS: 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

Nach rund einer Stunde wurde der Dialyse-Puffer gewechselt und die Proteine über Nacht gegen frischen Puffer dialysiert. Abschließend wurden die Proteine anhand eines SDS-Gels oder Western Blot nachgewiesen und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.5.3 Herstellung von Zellextrakt aus Pflanze

Zur Herstellung von Zellextrakt aus Pflanzen-Blattmaterial oder Pflanzen-Zellkultur wurden beide Komponenten mittels N₂ gefroren und in einem Mörser zermahlen. Das daraus entstandene gefrorene Pulver wurde in gleichen Teilen von Gewicht und Volumen mit Aufschlusspuffer vermischt, kurz auf Eis inkubiert und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation 50.000g, 4°C, 15 min entfernt. Der Überstand wurde sofort auf Eis gestellt und die Proteine mittels Antikörpern untersucht.

Aufschlusspuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8.6
10 mM EDTA
5 mM EGTA
2,5 mM DTT
1 mM AEBSF

2.5.4 Nachweis von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese

Eine Methode zum Nachweis von Proteinen sowie zur Abschätzung von Proteinkonzentrationen ist die SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page). Dazu wurden 12%ige Tris-Tricin-Polyacrylamidgele hergestellt.

Trenngel Stocklösung: 250 ml Acrylamid (1:37,5%)
 125 ml Tris/HCl (pH 8.8)
 1 ml SDS (10%)
 ad 500 ml MQ

Sammelgel Stocklösung: 13 ml Acrylamid (1:37,5%)
 8 ml Tris/HCl (pH 6.8)
 1 ml SDS (10%)
 ad 100 ml MQ

Zusammensetzung (2 Gele): Trenngel: 9 ml Trenngel-Stocklösung
 90 µl APS (10%)
 9 µl TEMED
 Sammelgel: 3 ml Sammelgel-Stocklösung
 30 µl APS (10%)
 3 µl TEMED

Durch die Polymerisation des Acrylamids bildet sich eine feinmaschige Gelstruktur, durch die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Während kleinere Proteine unter einer angelegten Spannung schneller durch das Gel wandern, bleiben größere Proteine zurück und bilden so ein größenabhängiges Bandenmuster. Die auspolymerisierten Gele wurden im Mini-PROTEAN® System der Firma BioRad zusammengebaut und mit 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet. Proteinproben wurden durch Zugaben von 10 x SDS-Probenpuffer und einer Inkubation von 10 min bei 95°C denaturiert und dabei ihrer Größe entsprechend mit negativen Ladungen versehen. Nach Auftrag der Probe sowie eines Größenstandards (Thermo Scientific™PageRuler™ Prestained Protein Ladder) auf das Gel wurde eine Spannung von 200V für 50 min angelegt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss mittels Coomassie-Lösung angefärbt. Dazu wurde das Gel mit der Färbelösung überschichtet, 60 sec in der Mikrowelle bei 450 Watt aufgewärmt und anschließend 10 min auf dem Kippschüttler inkubiert. Zum Entfärben des Gelhintergrunds wurde die Färbelösung abgossen und durch 10%ige Essigsäure ersetzt. Nach erneuten Erwärmen wurde das Gel solange auf dem Kippschüttler inkubiert, bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden.

SDS-Probenpuffer (10 x): 60 % Saccharose
20 % SDS
1 mM DTT
0,5 M Tris/HCl (pH 6.8)
0,1 % Bromphenol-Blau

SDS-Laufpuffer (1 x): 25 mM Tris/HCl (pH 8,8)
192 mM Glycin
0,1% SDS

Coomassie-Färbelösung: 25 % 2-Propanol
10 % Essigsäure
0,05 % Coomassie Brilliantblau R-250

Entfärbelösung: 10 % Essigsäure

2.5.5 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Um bestimmte Proteine selektiv in einem Zellextrakt aufzeigen zu können, wurde ein Western Blot als immunologischer Nachweis durchgeführt. Dieser Nachweis diente auch zur Bestätigung des Reinigungserfolgs eines Proteins und konnte zudem zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet werden. Dazu wurden die Proteinproben, wie oben beschrieben, in einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im Anschluss wurden sie in einem semi-dry Blotverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran) übertragen. Die Nitrocellulose-Membran sowie sechs Lagen an Whatman®-Papier wurden mit Elektrotransferpuffer befeuchtet und in der Reihenfolge 3 x Whatman®-Paper, Membran, Gel, 3 x Whatman®-Paper auf die Anodenseite des Blot-Apparats geschichtet. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 1 Stunde bei 25 V und 240 mA. Um unspezifische Antikörperbindungen an der Membran zu verhindern, wurde die Membran im Anschluss mit einer 4%igen Milchpulver-Lösung inkubiert. Nach 45 Minuten wurde die Milchpulver-Lösung abgegossen und die Membran 3 x für 10 min mit TBST-Puffer auf dem Kippschüttler gewaschen. Zur Detektion des bestimmten Proteins wurde ein selektiver erster Antikörper ausgewählt, entsprechend in TBS-Puffer verdünnt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen und mit dem zweiten, an HRP-(*horseradish peroxidase*) gekoppelten Antikörper eine Stunde inkubiert. Mittels dieses Enzyms wurde nach einem dreifachem Waschdurchgang die Chemilumineszenz unter Verwendung des SuperSignal™ West Femto Kit (Pierce) gemessen. Dazu wurde nach Angaben der Hersteller Peroxid Puffer und Luminol/Verstärker gemischt und auf die Membran gegeben. Der daraus resultierende Umsatz des Substrats führte an den Positionen der

HRP-gekoppelten Antikörper zu einer Chemilumineszenz, welche durch ein CCD Kamera (ImageQuant LAS4000 mini) detektiert wurde.

TBS(T)-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4
150 mM NaCl
(0,1% Triton)

Primäre Antikörper: anti-His-tag Antikörper (1:1.000) Roth
anti-CPK23L-N-Terminus (1:1.000) Genescript®
anti-CPK23L-C-Terminus (1:1.000) Thermo Scientific
anti-GST-tag Antikörper (1:1.000) Roth
anti-Phosphotyrosine (1:1.000) Sigma

Sekundäre Antikörper: Goat-anti mouse HRP-Konjugat (1:10.000) Pierce
Goat-anti rabbit HRP-Konjugat (1:10.000) Pierce

2.6 Proteinanalyse

2.6.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

Mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie wurde die Bindung von Calciumionen an die Calmodulin-ähnliche Domäne der CPK21 und CPK23L Proteine untersucht. Dazu wurden diese calciumfrei gereinigt. Alle verwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch mit 1 M HCl und calciumfreien Wasser gespült. Calciumfreies Wasser wurde über eine Chelex®-Säule der Firma Bio-Rad gewonnen, welches im Anschluss in gesäuberten Plastikflaschen gelagert wurde. Für die Messung wurden die Proteine auf einen Konzentration zwischen 50 µM – 80 µM eingeeengt. Die Initialisierung des Geräts sowie die Messungen erfolgten nach den Herstellerangaben des MicroCal®ITC® Handbuchs.

Mess-Bedingungen	H ₂ O zu H ₂ O	CaCl ₂ zu Puffer	CaCl ₂ zum Protein
Anzahl der Injektionen	20	40	40
Zelltemperatur in [°C]	25	25	25
Referenz Power [µcal/sec]	9	9	9
Einmalige Verzögerung [sec]	60	60	60
Rührgeschwindigkeit [rpm]	1000	300	300
Volumen der Injektion in [µl]	2	1	1
Dauer der Injektion in [sec]	4	2	2
Zeit zwischen den Injektionen [sec]	120	150	150
Filter Periode	5	5	5

2.6.2 *switch-sensor* Methode

Die Firma Dynamic Biosensors entwickelte eine *switch-sensor* Methode zur Messung von Bindungsaffinitäten, Konformationsänderungen und Proteingrößen von Proteinen. Dabei werden die Proteine über einzelsträngige DNA auf einem Gold-Chip fixiert und an diesen eine Wechselspannung angelegt. Aus der Frequenz der Auf- und Abwärtsbewegungen kann der dynamische Radius sowie bindungs- und konformationsbedingte Änderungen gemessen werden. In Kooperation mit Dynamic Biosensors wurde die durch Calcium hervorgerufene Konformationsänderung der calciumabhängigen Proteinkinasen analysiert. Dazu wurde 100 µg der Proteinkinase CPK23L, CPK23L vk sowie CPK21 über einen Bindungskit (Verwendung nach Herstellerangaben, Dynamic Biosensors) an einzelsträngige DNA gebunden und diese über ihren komplementären DNA Strang auf dem Gold-Chip fixiert. Die Messungen erfolgten mit Puffern ansteigender Calciumkonzentration, berechnet über MAXC, als Kontrolle diente die ungebunden DNA.

Mess-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,4
40 mM NaCl
10 mM MgCl₂
1 mM EGTA
x freie Calciumkonzentration

2.6.3 Phosphatase-Aktivitätstest

Um die Aktivität einer Phosphatase zu bestimmen, nutzt man deren Fähigkeit ein Substrat zu dephosphorylieren. Dazu wird die Phosphatase mit 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) Substrat inkubiert, welches durch Dephosphorylierung in 4-Methylumbelliferon umwandelt wird. Letzteres besitzt eine Fluoreszenz mit einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 460 nm, die durch einen PlateReader der Firma Biotek detektiert werden kann und direkt proportional zur Aktivität der Phosphatase verläuft. Durch diese Messmethode wurde einerseits die ABA-abhängige Inhibierung der PP2CA Phosphatase durch verschiedene RCAR11 Phospho-Varianten untersucht, andererseits die Aktivierung der PP2CA Phosphatase durch Titration von Proteinkinasen bestimmt. Nach einer Vorinkubation der Assay-Komponenten für 20 Minuten bei 35°C im Reaktionspuffer wurden die Ansätze in schwarze Microtiterplatten überführt (4 x 40 µl je Vorinkubation) und mit gleichem Volumen, auf 35°C vorgewärmtes, 2 x MUP Substrat versetzt. Während der Messung von 20 Minuten bei 30°C wurde die Fluoreszenz-Intensität in RUF (relative Fluoreszenzeinheit) detektiert und gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen. Die dadurch ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit ermöglichte den Vergleich der Ansätze untereinander. Um eine aktive Phosphatase zu gewährleisten, wurde für jede Messung frisches MnCl₂ hergestellt und erst kurz vor der Vorinkubationszeit zum Ansatz zugesetzt.

8 x Puffer: 800 mM Tris-HCl (pH 7,9)
800 mM NaCl
4 mM DTT

2 x MUP Substrat: 100 mM Tris-HCl (pH 7,9)
100 mM NaCl
5 mM 4-Methylumbelliferylphosphat
0,3 mM MnCl₂ (frisch hergestellt)

MnCl₂-Stammlösung: 1 M MnCl₂ in MQ; Endkonzentration 0,3 mM

Vorinkubation (200 µl): 25 µl 8 x-Puffer
3 µl 20 mM MnCl₂ (frisch hergestellt)
500 ng Phosphatase
optional: 500 ng RCAR; steigende ABA Konzentration
steigende Proteinkinase-Konzentration
ad 200 µl MQ

2.6.4 Radioaktiver Proteinkinase-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Proteinkinaseaktivität als auch der Analyse der potentiellen endogenen Substrate der Proteinkinasen wurden radioaktive Aktivitätstests durchgeführt. Dazu wurde radioaktiv markiertes γ -³²P-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/µmol der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland) verwendet und mit kaltem ATP gemischt. Dieses wurde zu der Proteinkinase in Kombination mit verschiedenen Substraten gegeben und die Übertragung der radioaktiven Phosphatgruppe auf das Substrat anhand eines Autoradiogramms oder einer Szintillationsmessung detektiert.

CPK-Puffer (1x): 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
10 mM MgCl₂
2 mM DTT
1 mM EGTA
0 - 1 mM freies Ca²⁺

OST1-Puffer (1x): 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
100 mM NaCl
10 mM MgCl₂
2 mM DTT
3 mM MnCl₂

Reaktionsansatz (20 µl): 2 µl CPK-/OST1-Puffer (10 x)
2 µl 2 mM ATP (γ -³²P-ATP 0,25 µCi)
1 µg Proteinkinase
1 µg Substrat
ad 20 µl MQ

Um eine calciumabhängige Aktivitätskurve der Proteinkinasen im Proteinkinase-Assay messen zu können, wurden die Proteine calciumfrei gereinigt sowie Puffer definierter Calciumkonzentration hergestellt. Dazu wurde anhand der Software MAXC (maxchelator.stanford.edu) die Konzentration der freien Calciumionen berechnet, welche durch das ebenfalls anwesende EGTA gepuffert wurden (Patton *et al.*, 2004). Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und im Radioaktiv-Labor mittels ATP gestartet. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 2 µl 10 x SDS-Probenpuffer respektive 2 µl 20% H₃PO₄ gestoppt. Die mit SDS-Proben versetzten Ansätze wurden 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluss an den Gel-Lauf wurde das Gel zwischen zwei Whatman®-Papiere gelegt und im Vakuum-Geltrockner bei 80°C für 4 Stunden getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in Frischhalte-Folie gepackt und mittels BAS Imaging Speicherphosphorplatten der Firma Fuji analysiert. Nach einer 12-stündigen Detektion wurde das Gel von der Phosphorplatte genommen und diese anhand des Laserscanners Fuji BAS-1800 Phosphor-Imager ausgewertet. Zur Analyse der mit Phosphorsäure gestoppten Reaktionsansätze wurden je drei Aliquots a' 5 µl auf Phosphocellulose-Papier (Whatman P81) der Firma GE pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Um das ungebundene ATP zu entfernen wurde das Papier dreimal mit 100 ml 0,85% Phosphorsäure gewaschen sowie durch 50 ml 70% EtOH, 100% EtOH und 100% Aceton getrocknet. Jedes Aliquot des Reaktionsansatzes wurde in ein Szintillationsröhrchen der Firma Roth (Karlsruhe) überführt, in welches 3 ml Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A der Firma Zinsser Analytic (Frankfurt) vorgelegt wurde. Die Messung der Proben erfolgte im Szintillationszähler (Packard Bell) für zwei Minuten.

2.6.5 Phosphorylierung zur massenspektrometrischen Auswertung

Im Proteinkinase-Aktivitätstest verifizierte Substrate der Proteinkinasen wurden zur genaueren Untersuchung der exakten Phosphorylierungsstellen zur massenspektrometrischen Analyse an die WWU Münster geschickt. Dazu wurde ein Reaktionsansatz von 100 µl hergestellt (siehe oben) und dieser nur mit kaltem ATP versetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Ansatz durch Zugabe von 10 µl 10 x SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proteine in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach Färbung der Proteine mittels Coomassie wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten, mittels einer Vakuumzentrifuge getrocknet und im Anschluss nach Münster verschickt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Detektion calciumabhängiger Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion

Eine Spezialisierung der Pflanzen und einiger Protozoen gegenüber anderen Eukaryonten entwickelte sich durch die Proteinfamilie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CPKs) mit 34 Mitgliedern, unterteilt in 4 Untergruppen (Harmon *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002). CPKs gehören zu den Serin/Threonin Proteinkinasen und bilden eine einzigartige Gruppe von Calcium-Sensoren. Aufgrund der C-terminal liegenden Calmodulin-ähnlichen Domäne können endogene Ca^{2+} Signale wahrgenommen werden, die eine Konformationsänderung des Proteins bewirken, wodurch das aktive Zentrum der Proteinkinase zugänglich wird (Wernimont *et al.*, 2011). Die aktivierte Proteinkinase kann so calciumabhängig eine Phosphorylierungskaskade auslösen und die zelluläre Antwort steuern (Sanders *et al.*, 2002). Dabei ist nicht nur ihre Aktivität sondern auch ihre Lokalisation von Bedeutung. Lokalisiert sind CPKs unter anderem im Zellkern, im Cytoplasma, an der Plasmamembran, in den Peroxisomen oder in der äußeren Mitochondrienmembran (Boudsocq und Sheen, 2013). Eine Verankerung in den Membranen wird meist durch eine posttranslationale Modifikation am N-Terminus der Proteine, der Myristoylierung oder Palmitoylierung, erreicht (Martín und Busconi, 2000). Um innerhalb dieser Proteinfamilie Unterschiede in Regulation und Funktion bestimmen zu können, ist sowohl die Lokalisation als auch die endogene Proteinkonzentration der jeweiligen CPK von Relevanz. Fokus dieser Arbeit liegt auf der calciumabhängigen Proteinkinase CPK23 aus den Arabidopsis Ökotypen Landsberg und Columbia, da ihr eine wichtige Rolle innerhalb der ABA-Signaltransduktion zugesprochen wird. Als Kontrollproteine dienen die ebenfalls im ABA-Signalweg agierenden Proteinkinasen OST1 und CPK21. Durch Korte (2009) konnte bereits eine Lokalisation des CPK23L Proteins in unterschiedlichen Zellmembranen gezeigt werden, die durch die N-terminale Modifikation herbeigeführt wird. Neben der Detektion ist aber auch die Quantifizierung des endogenen Proteinlevels dieser Proteinkinase ausschlaggebend, um deren Funktion und ABA-abhängige Expressionsmuster genauer zu bestimmen.

3.1.1 Detektion des CPK23 Proteins durch N- und C-terminale Peptidantikörper

Die Standardmethode zur Quantifizierung von Proteinmengen ist der Western Blot, wobei mit Hilfe spezifischer Antikörper Peptidsequenzen erkannt und gebunden werden. In der Regel werden dafür HA-tag oder GFP-tag Sequenzen verwendet, indem in transgenen Linien unter endogenem Promotor Fusionsproteine exprimiert werden. Hierbei besteht jedoch die Gefahr, dass der Positionseffekt des Transgens Einfluss auf die Proteinexpression nimmt und dadurch die Quantifizierung verfälscht. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurden Antikörper gegen Peptide der primären Aminosäuresequenz des CPK23L Proteins erzeugt. Hierbei war es wichtig auf die Spezifität sowie auf die Detektionsgrenze des Antikörpers zu achten. Ein spezifischer Antikörper konnte gegen ein Peptid der N-terminal gelegenen

Aminosäuren 42-56 des CPK23L Proteins in Maus hergestellt werden (Korte, 2009). Seine Spezifität beruht auf den letzten 6 Aminosäuren des Peptids, die in den CPK Homologen CPK23C und CPK21 nicht vorhanden sind (siehe Abb. 3.1 A, rote Sequenz). In Vorversuchen wurde dieser Antikörper gegen 25 ng eines rekombinant gereinigten CPK23L Proteins getestet, welches auf Nitrocellulose gebロットet wurde. Nach einer Inkubation von einer Stunde mit dem primären Antikörper erfolgte, nach Waschschriffen eine einstündige Inkubation mit einem sekundären α -Maus Antikörper, welcher eine Kopplung an das Enzym der *horsradish*-Peroxidase (HRP) aufwies. Nach wiederholten Waschschriffen wurde die Membran mit Luminolsubstrat und Verstärkerflüssigkeit dieser Peroxidase inkubiert und die daraus entstandene Chemilumineszenz am Luminometer detektiert. Trotz sachgemäßer Anwendung zeigte dieser Antikörper eine hohe Detektionsgrenze der Proteine und benötigte lange Belichtungszeiten von bis zu 30 Minuten und mehr. Um eine Alternative zu haben wurde ein neuer, C-terminaler Peptidantikörper konzipiert, der an die letzten 11 Aminosäuren des CPK23 Proteins bindet (Abb 3.1 A, blaue Sequenz).

A

N-terminaler Antikörper

```

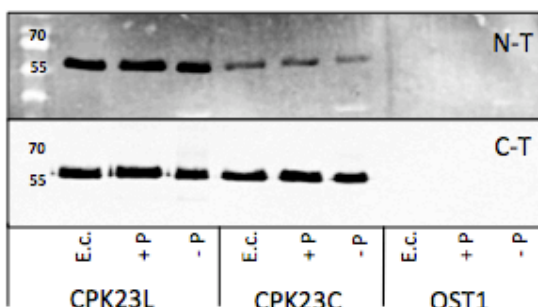
CPK23L  39 ISVRYPETILGKKGKALGILGKPFEDIRKFYSLGKELGRGGLGITYMCKEISTGNNYACKS
CPK23C  48 ISVRDPETILG-----KPFEDIRKFYSLGRELGRGGLGITYMCKEIGTGNIYACKS
CPK21   59 VSVRDPETILG-----KPFEDIRKFYSLGKELGRGQFGITYMCKEIGTGNTYACKS
          :*** *:*:****          *****:***** :*****,* ** *****
    
```

C-terminaler Antikörper

```

CPK23L  HITRDELESAMKEYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH 520
CPK23C  HITRDELESAMKEYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH 520
CPK21   HITRDELESAMKEYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGRINFEEFCAMMRSGSTQPQGLLPFH 531
          *****:***** ***** *:*:***:* **
    
```

B



C

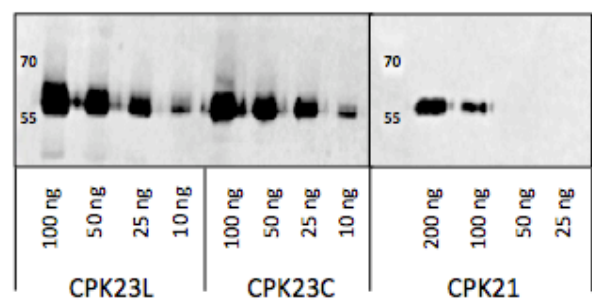


Abb. 3.1 Bestimmung der Nachweisgrenze und Spezifität der CPK23 Peptidantikörper

A) Aminosäuresequenzalignment der CPK23L, CPK23C und CPK21 Proteinkinasen. In Rot wurde die Zielsequenz des N-terminalen Peptidantikörpers markiert, in Blau die des C-terminalen. Die in den Proteinvarianten übereinstimmenden Aminosäuren innerhalb dieser Sequenzen wurden fett hervorgehoben. Identische Aminosäuren sind durch ein (*) gekennzeichnet, sehr ähnliche Aminosäuren durch einen (:), sowie ähnliche Aminosäuren durch einen (.) B) Nachweis von CPK23 durch N- und C-terminalen Antikörper. Aufgetragen wurden jeweils 25 ng Proteinproben der Proteine CPK23L, CPK23C und OST1. Von jedem Protein wurde eine direkt aus *E.coli* gereinigte Probe (E.c.), eine mit 2 mM ATP versetzte Probe (+P) und eine mit 5 Units alkalischer Phosphatase inkubierte Probe (-P) aufgetragen. Nach dem Gellauf und Blot-Verfahren wurden die Membranen jeweils eine Stunde mit primären sowie nach Waschschritten mit sekundären Antikörper inkubiert. Zur Auswertung wurde die Chemilumineszenz des Luminol-Umsatzes durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte HR-Peroxidase verwendet. Die Belichtungszeit zur Detektion der Chemilumineszenz des N-terminalen Antikörpers (N-T) betrug 30 min, während der C-terminale Antikörper (C-T) bereits nach einer Minute intensive Banden zeigte. C) Bestimmung der Spezifität des C-terminalen Antikörpers. Von CPK23L und CPK23C wurden Proteinkonzentrationen von 100 ng, 50 ng, 25 ng und 10 ng aufgetragen, für CPK21 wurde 200 ng, 100 ng, 50 ng und 25 ng Protein pro Spur verwendet. Die Detektion erfolgt wie unter B) beschrieben.

In Abb. 3.1 B) wurden beide Antikörper vergleichend mit den Proteinen CPK23L, CPK23C und OST1 untersucht. Augenmerk wurde hierbei auf ihre Sensitivität sowie den Einfluss der Auto-phosphorylierung auf die Antikörperbindung gelegt. Die erste Spur aller Proteine zeigt die Bande des unbehandelten, aus *Escherichia coli* gereinigten Proteins (E.c.). In der darauffolgenden Spur (+P) wurden die Proteine mit 2 mM ATP versetzt und 30 min inkubiert. Dadurch sollte eine vollständige Phosphorylierung aller Autophosphorylierungsstellen gewährleistet werden. Das genaue Gegenteil sollte der Zusatz des Proteins mit 5 Units alkalischer Phosphatase bewirken, die ebenfalls 30 min bei RT inkubiert wurde (-P). Im Vergleich des N-terminalen Antikörpers mit dem C-terminalen (Abb 3.1 B) erkennt man eine deutliche Verbesserung der Detektionsgrenze bei verkürzter Belichtungszeit, jedoch auch den Verlust der Spezifität zwischen CPK23L und CPK23C. Die ebenfalls untersuchte Negativ-Kontrolle OST1 wurde von keinem der verwendeten Antikörper detektiert. Überdies hatte auch der Phosphorylierungsstatus des jeweiligen Proteins keinerlei Einfluss auf die Bindefähigkeit des Antikörpers. Bei Verwendung des C-terminalen Antikörpers ergibt sich der Vorteil, dass dieser zur Detektion des CPK23L Proteins sowie mit gleicher Sensitivität zur Detektion des CPK23C Proteins verwendet werden kann. Dennoch muss sichergestellt werden, dass nicht alle nahe verwandten Proteinkinasen von diesem Antikörper detektiert werden. Aus diesem Grund wurde in Abb. 3.1 C) die Spezifität des Antikörpers zu den stark homologen Proteinen CPK23L, CPK23C und CPK21 untersucht und deren genaue Detektionsgrenze bestimmt. Da der C-terminale Antikörper gegen CPK23 aus Landsberg und Columbia gleichermaßen gerichtet war sowie auch Übereinstimmung mit der CPK21 Sequenz aufweist, wurde mittels rekombinantem Protein eine Konzentrationsreihe erstellt und in einem Western Blot gegen den C-terminalen Antikörper getestet. Das Ergebnis zeigt für CPK21 eine 10-fach höhere Detektionsgrenze von 100 ng, als für die CPK23 Proteine. In nachfolgendem Experiment wurde versucht das endogene CPK23 Protein im pflanzlichen Zellextrakt nachzuweisen.

3.1.2 Nachweis endogenen CPK23 Proteins im pflanzlichen Zellextrakt

Zum Nachweis endogenen CPK23 Proteins wurde Zellextrakt aus Blattmaterial einer Ler-0 Pflanze, wie in den Methoden 2.5.3 beschrieben, hergestellt. Dieser Zellextrakt wurde in vier 5 ml Fraktionen aufgeteilt, wovon zwei Fraktionen mit einer Protease-Inhibitor Tablette (cOmplete ULTRA Tablet, Roche) versetzt wurden, um vergleichend mit den anderen Fraktionen dessen Einfluss auf die Stabilität des Proteins zu untersuchen. Zudem wurde je eine Fraktion des Zellextrakts mit und ohne Protease-Inhibitor mit rekombinant gereinigtem Protein versetzt. Da der Nachweis durch einen Antikörper erfolgte, wurde die vorbereiteten Zellextrakt-Fraktionen in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran gebロットet. In Abb. 3.2 A) ist neben der Positiv-Kontrolle (1) in Spur 2 und 3 der Zellextrakt ohne und mit zugesetztem CPK23L Protein aufgetragen. Dieses war ohne Zellextrakt in der ersten Spur deutlich als Chemilumineszenz-Bande von rund 60 kDa zu erkennen, während in keiner der Zellextrakt Proben weder das endogene noch das rekombinant zugesetzte CPK23L Protein detektiert werden konnte. Dies könnte einerseits auf einem schnellen Abbau des Proteins beruhen oder andererseits an der sehr starken RuBisCO Bande liegen, die auf gleicher Höhe mit CPK23L läuft und die Membran absättigen könnte (weiße Banden). Um die Vermutung des Abbaus zu entkräften, wurde parallel ein Ansatz Zellextrakt mit einem Protease-Inhibitor verwendet. Da auch in diesem Ansatz kein CPK23L Protein detektiert werden konnte, wurde darauf geschlossen, dass RuBisCO die Membran bereits komplett abgesättigt hatte.

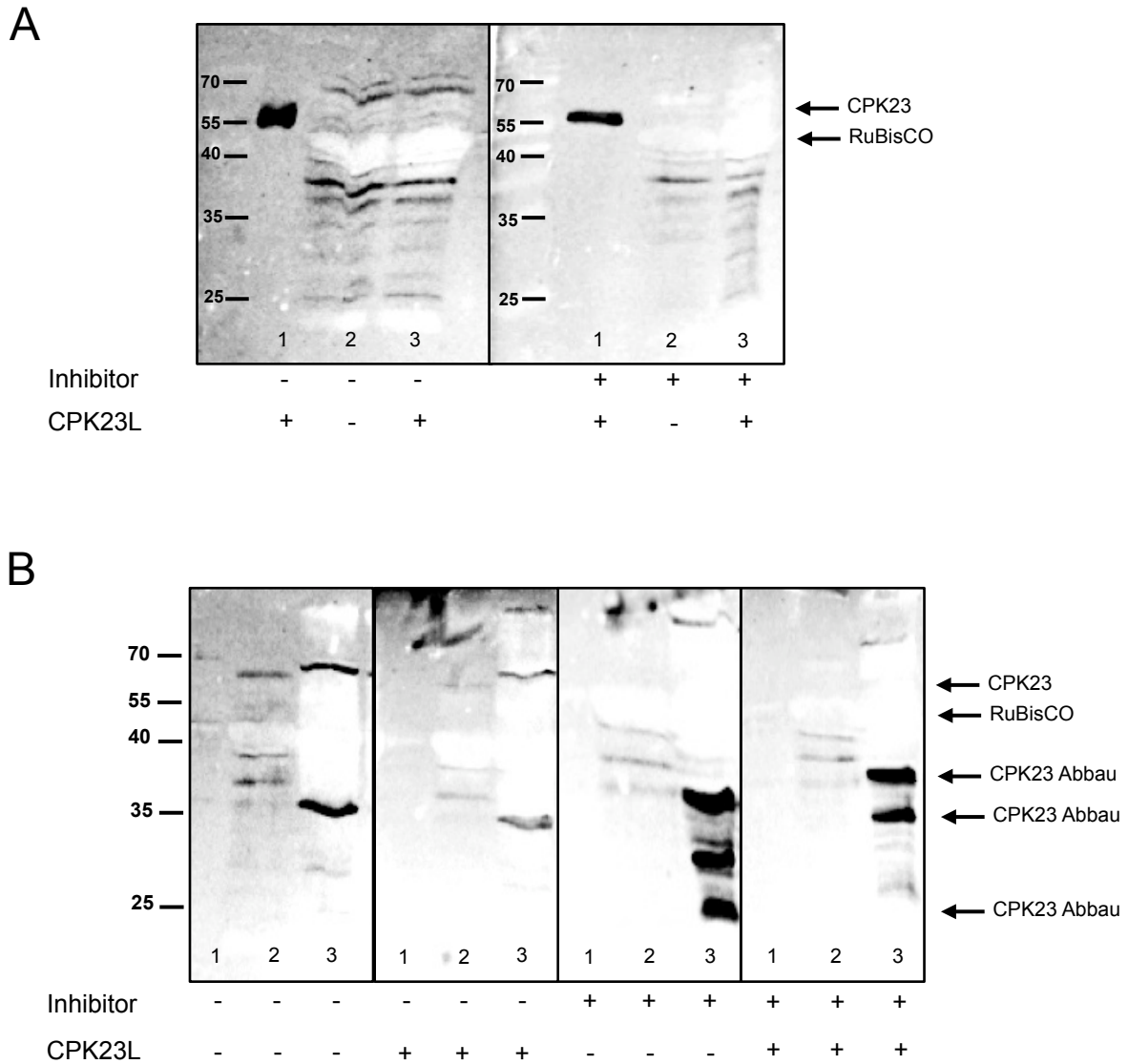


Abb. 3.2 Western Blot des Zellextrakts zum Nachweis endogenen CPK23 Proteins

A) Versuch des Nachweises von endogenen CPK23 Protein im pflanzlichen Zellextrakt (Zellextraktpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,6, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2,5 mM DTT, 1 mM AEBSF). Die linke Seite des Western Blots zeigt 15 µg des Zellextrakts ohne Zugabe des Protease-Inhibitors (cOmplete ULTRA Tablet, Roche), die rechte Hälfte mit. In Spur 1 ist jeweils eine Positiv-Kontrolle von 1 µg rekombinatem CPK23L aufgetragen, wodurch eine Chemilumineszenz-Bande von rund 60 kDa (MW: 59,8 kDa) detektiert wurde. Spur 2 und 3 zeigen den Zellextrakt, in Spur 3 versetzt mit rekombinatem CPK23L. Die weißen Banden zeigen eine deutliche Protein-Absättigung der Membran durch zelluläres Protein. B) Versuch des Nachweises von endogenen CPK23 in mit Ammoniumsulfat (30%) ausgefällten Zellextrakt. Die erste Spur enthält das Pellet der Fällung, während in der zweiten Spur der Überstand aufgetragen wurde. Spur 3 zeigt die Dialysefraktion des Überstandes gegen den Zellextraktpuffer, wodurch die Ammoniumsulfat Konzentration verringert wurde. Auch bei diesem Versuch wurde 15 µg Zellextrakt mit und ohne Protease-Inhibitor aufgetragen sowie Proben mit und ohne 1 µg zugesetztem rekombinatem CPK23L Protein. In keinem der untersuchten Ansätze konnte das rekombinant zugesetzte CPK23L Protein auf einer Höhe von 60 kDa detektiert werden. Durch Zusatz des Protease-Inhibitors konnten jedoch Proteinbanden von rund 25 kDa, 27 kDa und 35 kDa vom Antikörper erkannt werden, die in den Fraktionen ohne Inhibitor nicht oder nur sehr schwach zu detektieren waren.

Zur Verminderung der RuBisCO Bande wurde eine 30%ige Ammoniumsulfat-Fällung der Zellextrakte durchgeführt (Robinson *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2002; Cutler, 2004) und die Pellet- bzw. Überstand-Fraktion sowie die Dialyse des Überstandes analysiert (Abb. 3.2 B). Mit einer Größe von rund 35 kDa erkennt man in der Dialysefraktion eine Bande, die durch Zugabe des Protease-Inhibitors verstärkt wurde. Zudem erschienen noch weitere Banden von 27 kDa und 25 kDa Größe, die in den Proben ohne Protease-Inhibitor nicht zu detektieren waren. Generell ist jedoch kein Unterschied zwischen den Fraktionen mit endogenem und mit rekombinant zugesetztem Protein zu erkennen. Dies lässt die Frage aufkommen, ob es sich hier um Abbau-Banden des 59,8 kDa großen CPK23L Proteins oder um unspezifische Banden handelt. Zudem war nach der Ammoniumsulfat-Fällung immer noch RuBisCO- Kontamination in der Probe, wodurch die Detektion des rekombinaten Proteins verhindert wurde. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in den nachfolgenden Experimenten Zellextrakt aus Pflanzenzellkultur verwendet. Diese Pflanzenzellsuspension enthält nur wenig Chlorophyll und somit nur geringe Mengen an störendem RuBisCO Enzym. Zur Untersuchung des möglichen CPK23L Abbaus wurde Zellextrakt verschiedener Ökotypen aus Pflanzenzellsuspension vorbereitet. Neben dem Landsberg Wildtyp wurde auch ein potentieller CPK23L Überexpressor *gca2-1* und eine *knockout*-Linie CPK23-ko verwendet. Der Zellextrakt puffer diente für diesen Fall als Kontrolle. Der Zellextrakt puffer diente für diesen Fall als Kontrolle.

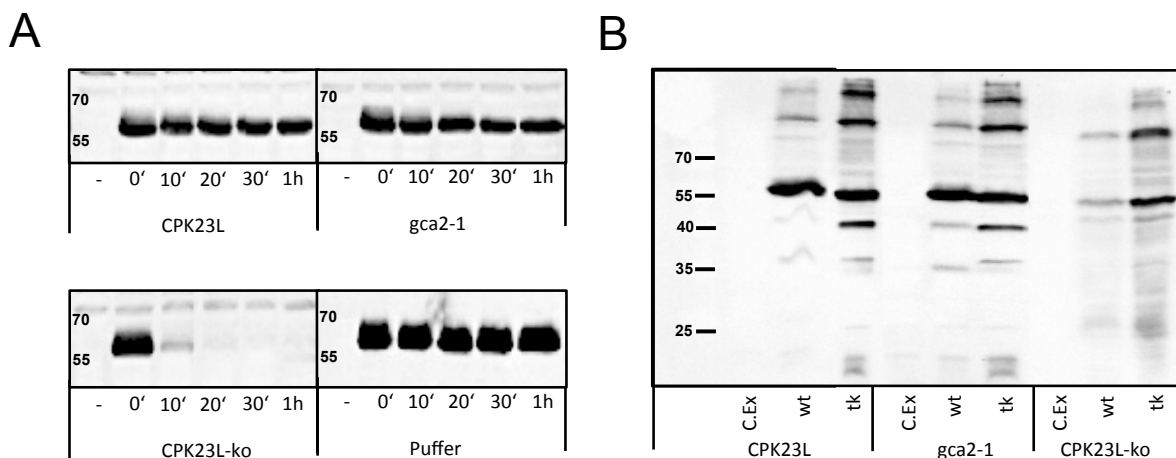


Abb. 3.3 Untersuchung auf Abbau des CPK23 Proteins im Zellextrakt aus Pflanzenzellkultur

A) Nachweis von rekombinantem CPK23 Protein in Pflanzenzellsuspension. Es wurde 3 µg Zellextrakt aus Ler-0 (CPK23L), einer vermuteten CPK23L Überexpressions-Zellkultur (*gca-1*) und einer CPK23L *knockout* Zellkultur (CPK23-ko) hergestellt (Zellextrakt puffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,6, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2,5 mM DTT, 1 mM AEBSF) und mit 500 ng rekombinantem CPK23L Protein versetzt. Als Kontrolle diente rekombinantes Protein in Zellextrakt puffer. Es wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten 0' bis 1h genommen und mittels N-terminalen Antikörpers, mit einer Belichtungszeit von 30 min detektiert. In Abbildung B) wurde untersucht, ob die Aktivität des Proteins Einfluss auf dessen Stabilität hat. Dafür wurden Zellextrakte der Wildtyp Ler-0 CPK23L, der potentiellen Überexpression *gca2-1* und des *knockout* CPK23-ko Pflanzenzellkultur verwendet. Diesmal wurden die Zellextrakte ohne Zusatz in der ersten Spur, mit Zusatz von aktivem 125 ng rekombinantem gereinigtem Protein CPK23L in Spur 2 und in Spur 3 mit gleicher Menge inaktivem CPK23L-tk Protein versetzt. Die Detektion erfolgte mittels C-terminalen Antikörpers, wobei die Belichtungszeit 5 min betrug.

Zu den hergestellten Pflanzenzellsuspensionen wurde 500 ng rekombinant gereinigtes CPK23L Protein gegeben und dessen möglicher Abbau bei RT zeitlich verfolgt. Dafür wurde nach 0 min, 10 min, 20 min, 30 min und einer Stunde Proben entnommen, welche im Anschluss anhand eines Western Blots analysiert wurden. Wie in Abbildung 3.3 A) zu sehen ist, konnte ohne das bis dahin überlagernde RuBisCO Enzym eine Proteinbande des rekombinant zugesetzten Proteins detektiert werden. In den Linien CPK23L und *gca2-1* fand ein leichter Abbau des CPK23L Proteins im Vergleich zur Puffer-Kontrolle statt. Hingegen zeigte die CPK23-ko Linie nach 10 min eine deutlich reduzierte Proteinbande, die bereits nach 20 min Inkubation nicht mehr detektiert werden konnte. Ob dieser Abbau auf die Aktivität der Proteinkinase zurückzuführen ist, wurde im Anschluss untersucht und in Abb. 3.3 B) dargestellt. Dafür wurde Zellextrakt aus Pflanzenzellkultur ohne rekombinantes Protein, mit rekombinanten CPK23L Protein und mit einer inaktiven Proteinkinase CPK23L-tk versetzt. Auch in diesem Fall wurde ein Unterschied zwischen den sich gleich verhaltenden CPK23L und *gca2-1* Linien sowie der *knockout* Linie CPK23-ko beobachtet. In letzterer war das zugesetzte Protein der aktiven Form nur noch schwach zu detektieren, während die inaktive Form reduziert, aber deutlich erkennbar als Bande vorlag. Da in der *knockout*-Linie das endogene Protein nicht vorhanden ist, reagiert womöglich die Abbau-Kaskade auf das rekombinant zugesetzte Protein und führt zu einem Abbau der aktiven Proteinkinase, jedoch zu einem begrenztem Abbau der inaktiven Form.

3.2 Bestimmung der Ca^{2+} Affinität sowie Ca^{2+} Aktivierung der Proteinkinasen

Calcium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff zur Regulation von Entwicklungsprozessen sowie zur Antwort auf biotischen oder abiotischen Stress und ist mit dieser Aufgabe in allen Eukaryonten vertreten (Kudla *et al.*, 2010; Dodd *et al.*, 2010; Webb, 2013). Cytosolisch liegt die freie Calciumkonzentration bei rund 30-90 nM, kann jedoch in anderen Zellkomponenten wie Vakuole und Zellmembran bis in den millimolaren Bereich ansteigen (Clarkson *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 1989). Zur Weiterleitung eines Calciumsignals ist jedoch nicht nur die lokale Konzentration dieses sekundären Botenstoffes ausschlaggebend sondern auch dessen Frequenz, Amplitude und Länge sind von herausragender Bedeutung (McAinsh *et al.*, 1995). Diese Calciumsignatur kann von calciumabhängigen Proteinkinasen durch eine N-terminal gelegene Calmodulin-ähnliche Domäne erkannt werden und führt über eine calciuminduzierte Konformationsänderung zu deren Aktivierung (Wernimont *et al.*, 2011). Dabei gibt es allerdings große Unterschiede innerhalb der Familie der CPKs. So haben manche Vertreter eine erhöhte Affinität zu Calcium und sind durch dieses stark aktivierbar, während andere hingegen bereits ohne Calcium eine Basalaktivität aufweisen, die durch Calcium nur noch minimal verstärkt werden kann (Boudsocq *et al.*, 2012). Um die Bedeutung von Ca^{2+} für die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C sowie CPK21 und die daraus resultierenden zellulären Antworten zu verstehen, ist es notwendig sowohl die Ca^{2+} Bindung als auch die dadurch mit einhergehende Aktivierung genau zu untersuchen.

3.2.1 Messung von Ca^{2+} Affinitäten mittels isothermer Titrationskalorimetrie

Als erste Methode zur Messung der Calciumaffinität wurde die isotherme Titrationskalorimetrie, kurz ITC verwendet, die auf der Tatsache beruht, dass jede Bindung exotherme oder endotherme Energie freisetzt bzw. benötigt. Dabei wird durch quantitatives Auslesen der Temperaturänderung während einer Bindung zweier Komponenten, in Abhängigkeit der Konzentration der Reaktanden, deren Affinität zueinander bestimmt. Für die Messung wird ein Bindungspartner in einer Messzelle vorgelegt, der zweite Bindungspartner durch eine Spritze in genau definierten Schritten hinzutitriert und die dadurch hervorgerufene Änderung der thermodynamischen Energie in der Zelle gemessen. Zur Initialisierung und Bestimmung der Sensitivität des Geräts wurde eine Ca^{2+} zu EGTA Titration vorgenommen (Abb. 3.4 A bis C). Hierfür wurde EGTA in der Messzelle vorgelegt und Calciumchlorid titriert. Im oberen Teil der Abbildungen sind die Rohdaten der Messung in Form der Energiefreisetzung in $\mu\text{cal}/\text{sec}$ über den Verlauf von 90 Minuten aufgezeichnet. Darunter ist die integrierte Kurve dieser Rohdaten zu sehen, welche in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses der Komponenten zueinander die freigesetzte Energie pro mol widerspiegelt.

ERGEBNISSE

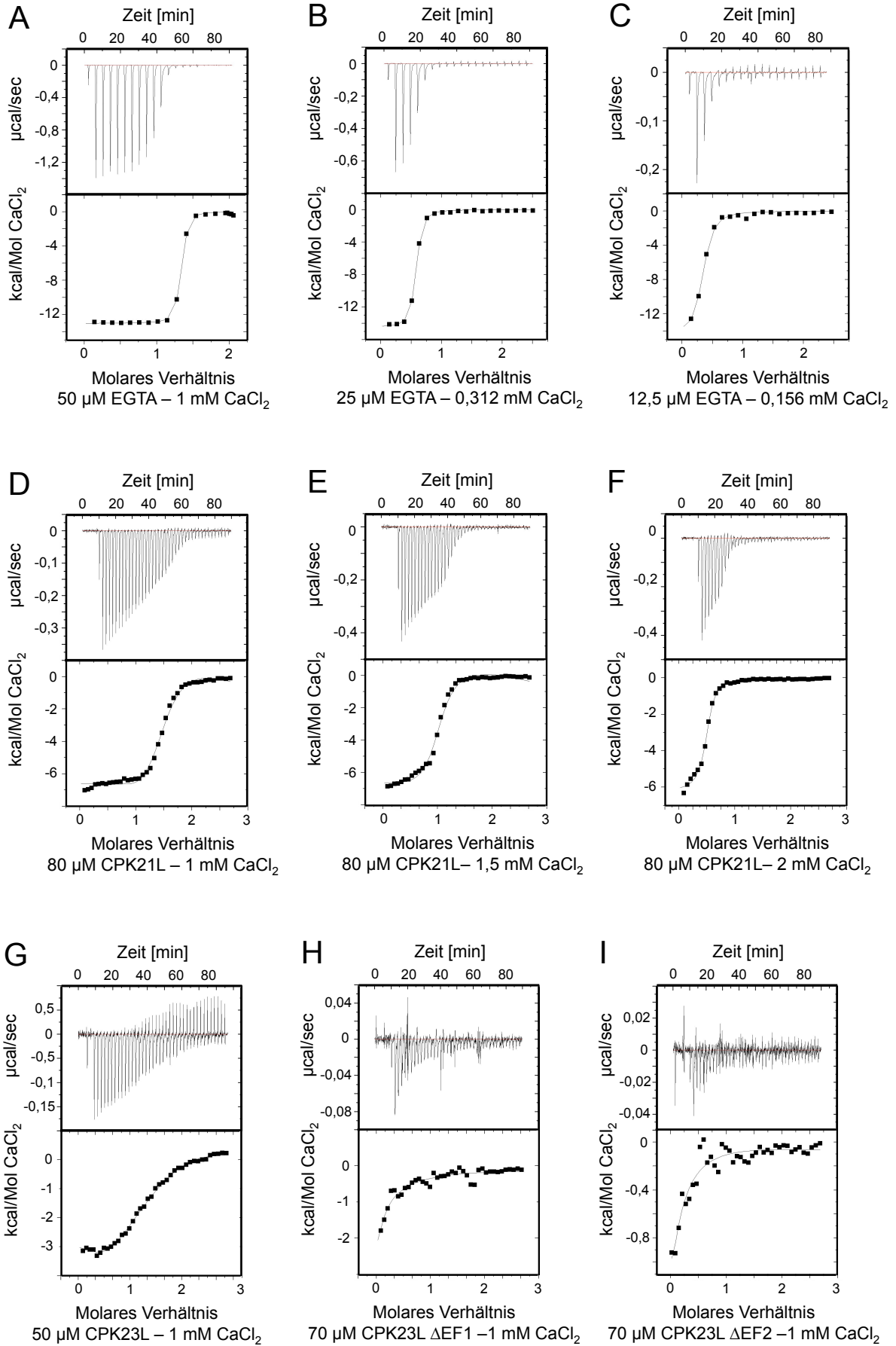


Abb. 3.4 Isotherme Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Ca^{2+} Affinität von CPK23L und CPK21

Die Messungen wurden an einem MicroCal® iTC₂₀₀ MicroCalorimeter (Ge Helathcare) mit 200 μl Zell-Volumen durchgeführt. Es wurden 40 Injektionen bei 25°C mit einem Injektionsvolumen von 1 μl und einer Injektionsdauer von 2 sec vorgenommen. Messung A) bis C) zeigen die Rohdaten in $\mu\text{cal}/\text{sec}$ sowie die integrierten Werte in kcal/Mol CaCl_2 der ITC Titrationsen von CaCl_2 zu EGTA mit abnehmender EGTA Konzentration. Messung D) bis F) zeigen die Rohdaten in $\mu\text{cal}/\text{sec}$ sowie die integrierten Werte in kcal/Mol CaCl_2 der ITC Titrationsen von zunehmenden CaCl_2 Konzentration zu 80 μM CPK21 Proteinkinase. Messung G) bis I) zeigen die Rohdaten in $\mu\text{cal}/\text{sec}$ sowie die integrierten Werte in kcal/Mol CaCl_2 der ITC Titrationsen von 1 mM CaCl_2 zu 50 μM CPK23L, 70 μM CPK23L ΔEF1 sowie 70 μM CPK23L ΔEF2 .

Im Verlauf der Abbildung 3.4 A) bis C) wurde jeweils die EGTA Konzentration halbiert, während das molare Verhältnis der Reaktanden in etwa konstant gehalten wurde. Durch diese gemessene Konzentrationsreihe wurde deutlich, wie stark die Messbarkeit der Daten von der Konzentration der Zell-Komponente, hier EGTA, abhängt. Mit Abnahme der EGTA Konzentration in der Zelle verringerte sich proportional die Signalstärke der Rohdaten, wobei unterschiedliche CaCl_2 Konzentrationen das molare Verhältnis und damit das Plateau der Kurven beeinflusst. In der Messreihe Abb. 3.4 D) bis F) ist die Messung des rekombinant und Ca^{2+} -frei gereinigten CPK21 Proteins zu sehen. Für diese Messungen war eine Proteinkonzentration von 80 μM notwendig, um ein ausreichendes Signal zu erhalten. Wie bei EGTA war es anhand verschiedener CaCl_2 Konzentrationen des Titranten möglich, die Messkurve in einen für die K_D -Wert-Bestimmung optimalen Bereich zu verschieben. Die K_D -Werte der CPK21 Proteinkinase in Abb. 3.4 D) wurden durch Einbeziehung eines Bindungsmodells mit vier Calcium Bindestellen berechnet. Zwei der Calcium Bindungsaffinitäten liegen in einem niedrigen micromolaren Bereich von $3,1 \mu\text{M} \pm 0,32 \mu\text{M}$ und $1,3 \mu\text{M} \pm 0,11 \mu\text{M}$, wohingegen die anderen zwei Bindungsstellen die Affinitäten-Extrema von $45 \text{ nM} \pm 2,8 \text{ nM}$ und $120 \mu\text{M} \pm 11 \mu\text{M}$ besitzen. Ähnliche K_D -Werte konnten aus der Messung in Abb. 3.4 E) berechnet werden, während Abb. 3.4 F) aufgrund des fehlenden ungebundenen Zustandes keine sinnvolle Auswertung ermöglichte. In Abbildung 3.4 G) wurde eine ITC Messung des CPK23L Proteins mit einer Konzentration von 50 μM durchgeführt. Für das verwendete Bindungsmodell wurden hierbei nur drei Bindestellen angegeben, da man aufgrund der CPK23L Sequenz davon ausgehen muss, dass die erste EF Hand kein Calciumion binden kann. Aus der Berechnung ergaben sich K_D -Werte von $2,3 \mu\text{M} \pm 0,41 \mu\text{M}$, $18 \mu\text{M} \pm 2,5 \mu\text{M}$ und $23 \mu\text{M} \pm 3,2 \mu\text{M}$ für alle drei Bindestellen des CPK23L Proteins. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, sollten CPK23L EF Hand Mutanten der ersten und zweiten EF Hand gemessen werden (siehe Abbildung 3.6). Leider war es für die Varianten CPK23L ΔEF1 in Abb. 3.4 H) und CPK23L ΔEF2 Abb. 3.4 I) nicht möglich, auswertbare Daten zu erhalten, obwohl eine hohe Konzentration von 70 μM eingesetzt wurde. Mit diesen Messungen ist man augenscheinlich an die Sensitivitätsgrenze des MicroCal® iTC₂₀₀ MicroCalorimeter gestoßen. Um dennoch genaue Daten über die Calciumbindung der CPK Proteine messen zu können, wurde die Methode gewechselt und auf die neu auf den Markt gebrachte Technik des *switch-sensors* der Firma Dynamic Biosensors zugegriffen.

3.2.2 Messung der Ca^{2+} abhängigen Konformationsänderung durch eine *switch-sensor* Methode

Eine neu entwickelte Methode zur Messung von Bindungsaffinitäten durch Analyse der aus der Bindung entstehenden Konformationsänderung sowie zur Messung von Proteingrößen beruht auf einem Gold-Chip *switch-sensor* der Firma Dynamic Biosensors. Dabei wird auf einen Gold-Chip einzelsträngige DNA aufgetragen, über die ein Protein fixiert werden kann. An den Gold-Chip wird eine Wechsellspannung angelegt, woraufhin sich das gebundene Protein entsprechend seines dynamischen Radius auf- und abwärts bewegt. Ändert sich der dynamische Radius aufgrund einer Bindung oder einer Konformationsänderung des Proteins, wird dies durch die dadurch veränderte Frequenz der Auf- und Abwärtsbewegung messbar. Auf diesem Prinzip soll die durch Calcium hervorgerufene Konformationsänderung der calciumabhängigen Proteinkinasen analysiert werden.

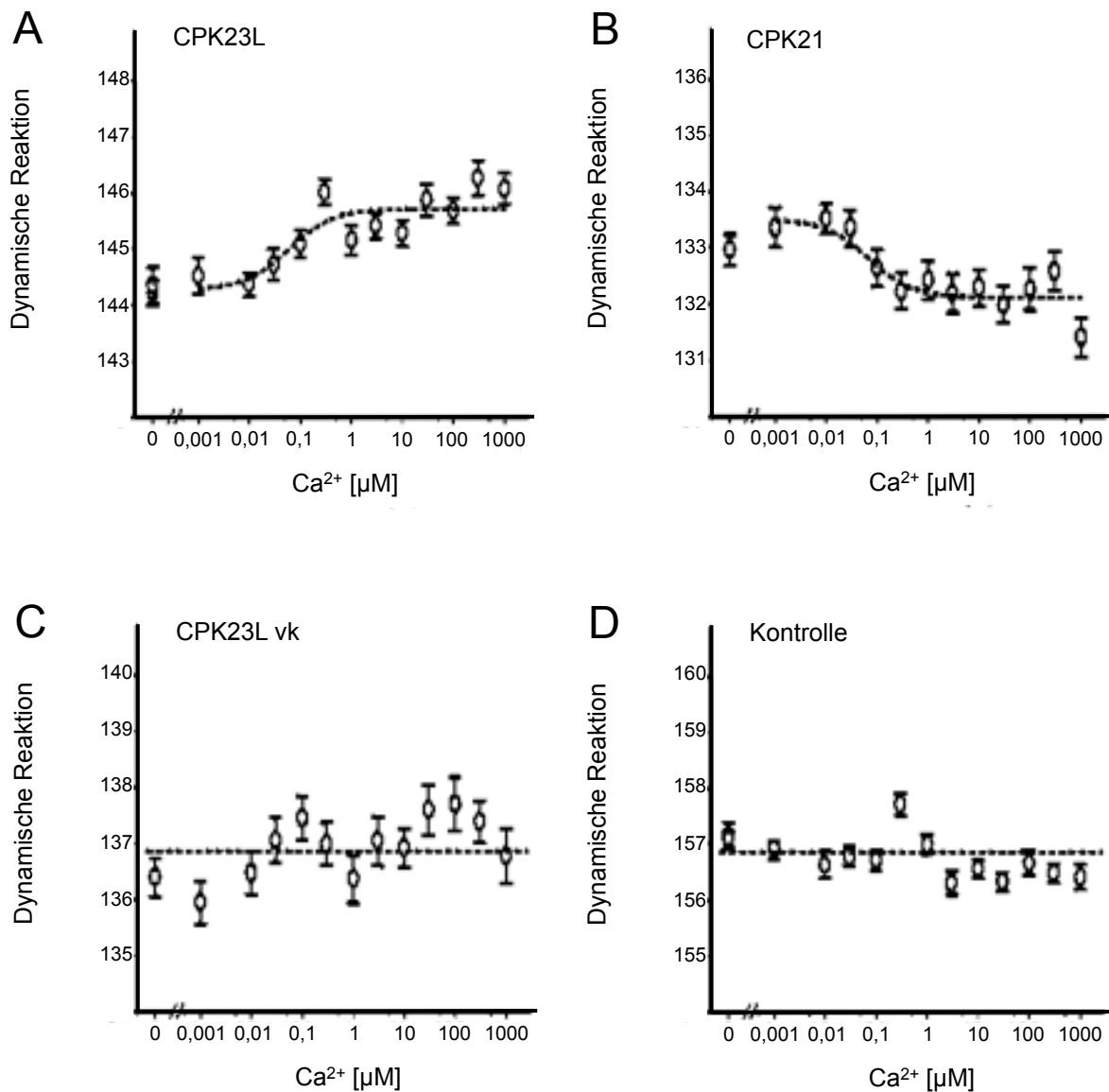


Abb. 3.5 *switch-sensor* Messung zur Bestimmung der Ca^{2+} abhängigen Konformationsänderung

Für die Messungen wurden 100 μg Proteinkinase mit Hilfe eines Bindungskits (Dynamic Biosensors) an einzelsträngige DNA gebunden und über den komplementären DNA Strang auf dem Gold-Chips fixiert. Die Messungen erfolgten mit Puffern (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA) und ansteigender freier Calciumkonzentration. Aufgetragen ist die auf dem Gold-Chip gemessene dynamische Reaktion gegen die im jeweiligen Puffer enthaltene Calciumkonzentration in $[\mu\text{M}]$. A) Dynamische Reaktion des CPK23L Proteins unter steigender Calciumkonzentration. B) Dynamische Reaktion des CPK21 Proteins unter steigender Calciumkonzentration. C) Messung der dynamischen Reaktion des um die Calmodulin-ähnliche Domäne verkürzten CPK23L vk Proteins. D) Kontrollmessung der dynamischen Reaktion der ungebundenen DNA.

Für die Messung wurden die zu untersuchenden Proteine rekombinant gereinigt und in Kooperation mit der Firma Dynamic Biosensors (Martinsried) gemessen. Eine Messung wurde durchgeführt, indem Puffer steigender Calciumkonzentration nacheinander auf den mit CPK Proteinen gebundenen Chip inkubiert wurden. Aufgetragen wurde die gemessene dynamische Reaktion gegen die im Puffer enthaltene Calciumkonzentration in $[\mu\text{M}]$. In Abb. 3.5 A) wurde die Ca^{2+} -frei gereinigte CPK23L Proteinkinase auf den Gold-Chip fixiert und mit Puffern steigender Calciumkonzentration analysiert. Aus der abgebildeten Kurve lässt sich eine deutliche Zunahme der dynamischen Reaktion und damit eine durch Calciumbindung hervorgerufene Konformationsänderung erkennen. Der aus dieser dynamischen Reaktion abgeleitete K_D -Wert des Proteins liegt bei $0,36 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$ Calcium. Die gleiche Methode angewendet auf das CPK21 Protein zeigte in Abb. 3.5 B) ebenfalls eine dynamische Reaktion, jedoch in entgegengesetzter Richtung. Auch für diese Proteinkinase konnte eine calciumabhängige Konformationsänderung detektiert werden, deren K_D -Wert bereits bei einer Calciumkonzentration von rund 50 nM liegt. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Daten auf der Konformationsänderung der Calmodulin-ähnliche Domäne beruhen, wurde das CPK23L Protein um diese Domäne verkürzt und erneut gemessen. In Abb. 3.5 C) ist die dynamische Reaktion der CPK23L vk Variante gegen die Calciumkonzentration aufgetragen, wobei die gemessenen Daten um einen Wert schwanken. Die in Abb. 3.5 D) dargestellte Kontrollmessung des ungebundenen Gold-Chips zeigte ebenfalls nur leichte Abweichungen vom Ausgangswert. Anhand dieser Methode konnte eine Konformationsänderung des CPK23L und CPK21 Proteins durch Faltung der Calmodulin-ähnlichen Domäne nachgewiesen werden. Inwieweit diese Konformationsänderung die Aktivität der Proteinkinase beeinflusst, kann in einem radioaktivem Aktivitätstest ermittelt werden.

3.2.3 Messung der Ca^{2+} induzierten Proteinkinaseaktivität von CPK23L, CPK23C und CPK21

Die Annahme, dass durch Bindung von Ca^{2+} Ionen eine Konformationsänderung der Calmodulin-ähnlichen Domäne stattfindet, die das aktive Zentrum der Proteinkinase frei gibt und damit die Aktivität des Proteins reguliert, wurde nachfolgend durch Messung eines radioaktiven Aktivitätstest untersucht. Im Allgemeinen ist eine Proteinkinase in der Lage proportional zu ihrer Aktivität sowohl sich selbst als auch Substrate zu phosphorylieren. Um diese Phosphorylierung nachzuweisen, wurden Aktivitätstests mit radioaktivem $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ und dephosphoryliertem Casein-Substrat durchgeführt. Das auf das Substrat übertragene radioaktive Phosphat kann anhand eines Szintillationszählers bzw. durch Autoradiogramme detektiert werden. In den nachfolgenden Versuchen wurden Proteinkinasen mit Puffern ansteigender Ca^{2+} Konzentration inkubiert und deren Einfluss auf die Proteinkinaseaktivität gemessen.

In Abb. 3.7 A) wurden die im ABA-Signalweg involvierten Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und CPK21 auf ihre Calciumaffinität analysiert und untereinander verglichen. Aufgetragen ist die Aktivität in pkat/mg der Proteinkinase gegen die Calciumkonzentration des jeweiligen Puffers in $[\mu\text{M}]$. In dieser Abbildung zeigte CPK21 eine stark durch Calcium induzierbare Aktivitätskurve mit einem K_D -Wert von rund 500 nM. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen war diese Proteinkinase nicht aktiv und wurde erst durch Calciumzugabe aktiviert. Im Gegensatz dazu war für CPK23L und CPK23C bereits eine höhere Basalaktivität zu erkennen. Diese Proteinkinasen waren bereits ohne Calcium im Puffer aktiv und wurden durch Calcium nur marginal um das 0,5 fache aktiviert. Ihr K_D -Wert liegt bei rund 3 μM Calcium. Da in der Regel die Calciumbindung des Proteins über vier konservierte EF Hände erfolgt, ist es von großem Interesse, den Einfluss jeder einzelnen EF Hand auf die gesamte Calciumbindung des Proteins zu erforschen. Dazu wurden von CPK23L, CPK23C und CPK21 EF Hand *knockout* Mutanten der einzelnen EF Hände erzeugt, gereinigt und deren Aktivität calciumabhängig gemessen (Zhao *et al.*, 1994).

ERGEBNISSE

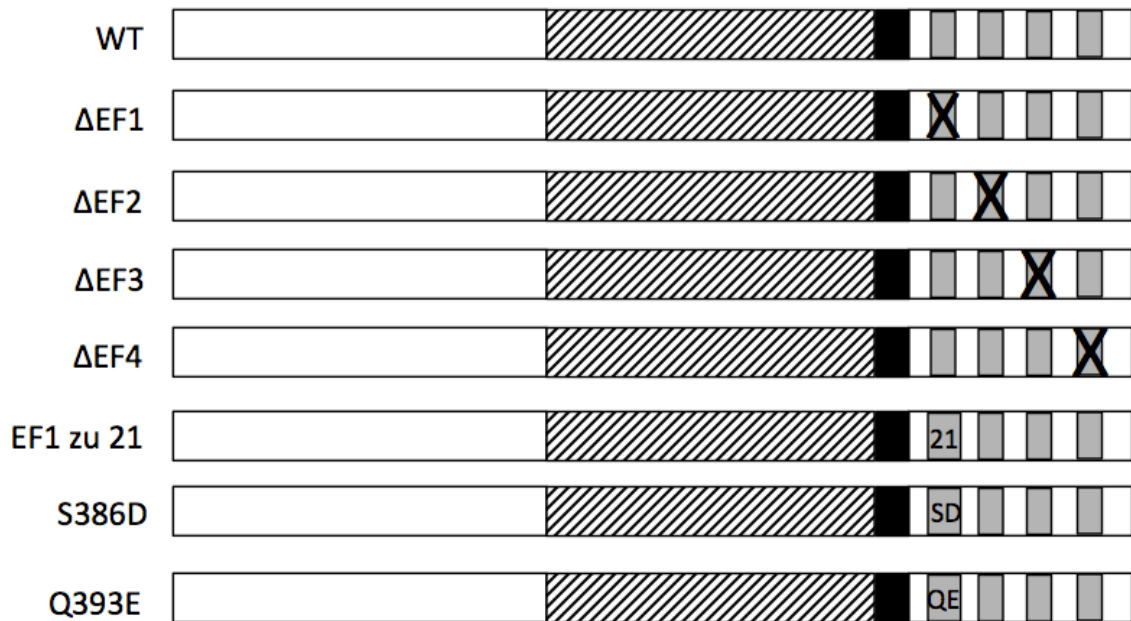


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der EF Hand Mutationen

Zur Bestimmung der Calcium-Bindungsaffinitäten der einzelnen EF Hände der CPK23L, CPK23C und CPK21 Proteinkinasen wurden *knockout* Mutationen (Δ EF1 - Δ EF4) eingeführt. Durch Veränderungen der kanonischen EF Hand Sequenz dieser Proteinkinasen wurde eine Calciumbindung an die jeweilige EF Hand unterdrückt (Zhao *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 2011). Zudem wurden Aminosäure-Substitutionen erzeugt, welche in CPK23L und CPK23C zu einer kanonischen Sequenz der ersten CPK21 EF Hand führten. Neben diesen Varianten wurde für CPK23L Substitutionen der ersten EF Hand Serin³⁸⁶ D sowie Glutamin³⁹³ E hergestellt, um deren Einfluss auf die Calciumion Bindung zu untersuchen (Abbildung verändert aus Franz, S., Ehlert, B., Liese, A., Kurth, J., Cazale, A.C. und Romeis, T. (2011). Calcium-dependent protein Proteinkinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 4, 83-96. Abgedruckt mit der Erlaubnis von Elsevier).

Abbildung 3.7 B) zeigt die Aktivitätskurven des CPK23L wildtyp Proteins sowie die Kurven seiner Δ EF1 und Δ EF2 *knockout* Varianten. Generell konnte nur eine sehr geringe Aktivierung durch Calcium in Wildtyp und Δ EF2 Variante gemessen werden. Diese war aber nach Mutation der ersten EF Hand nicht mehr zu detektieren (Kreise). Eine Rückmutation der ersten EF Hand in die EF Hand Sequenz der stark Ca^{2+} aktivierbaren CPK21 (graue Kreise) ermöglichte es diese Aktivierung wieder zu erreichen. Dasselbe wurde in Abb. 3.7 C) für das CPK23C Protein des Ökotyps Columbia gemessen, wobei hier zusätzlich die EF Hand Varianten von Δ EF3 und Δ EF4 analysiert wurden. Alle Varianten wiesen eine leichte calciuminduzierte Steigerung der Aktivität auf bis, wie bei CPK23L auch, auf die Variante der Δ EF1 Hand. Diese stagnierte auf der zu Beginn detektierten Basalaktivität. Mutierte man CPK23C Δ EF1 jedoch in das entsprechende CPK21 Pendant (graue Rechtecke), konnte die Calciumsensitivität wieder erreicht werden.

ERGEBNISSE

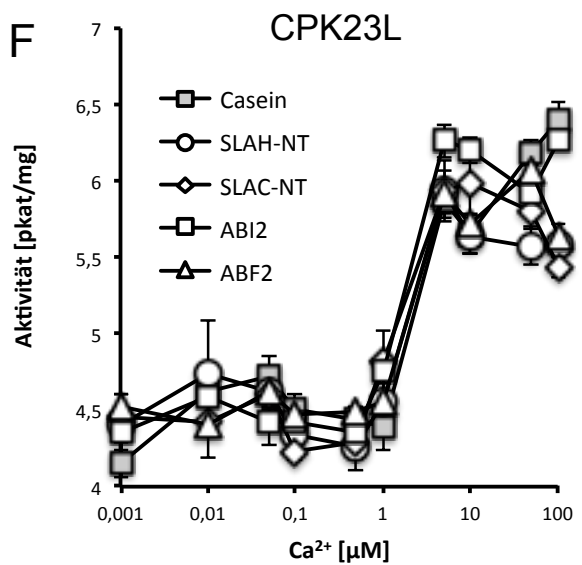
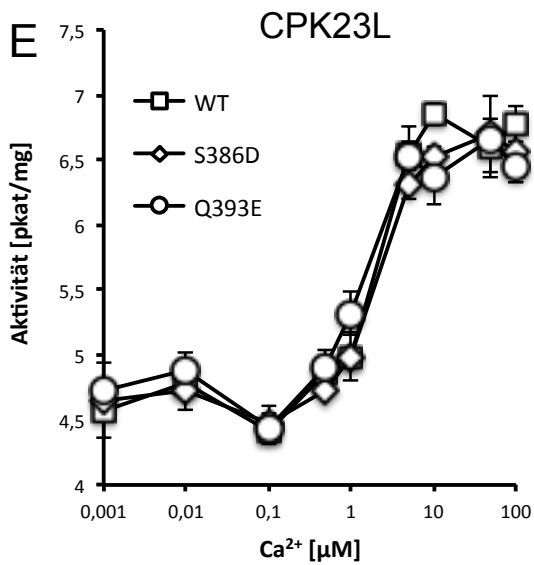
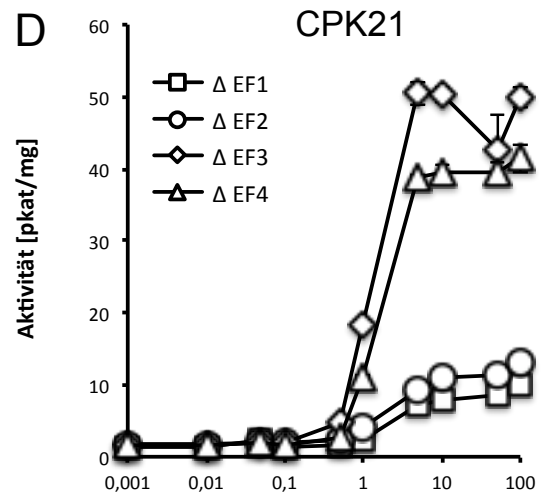
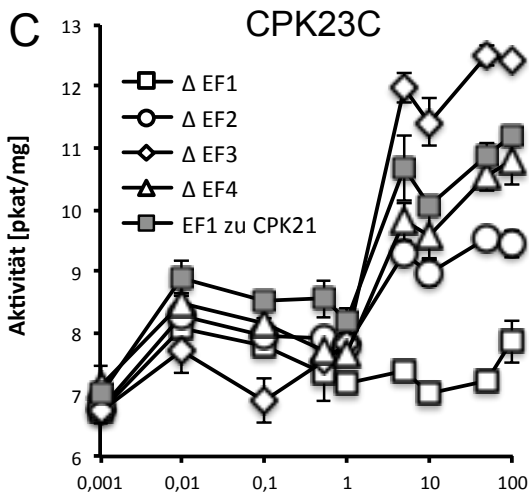
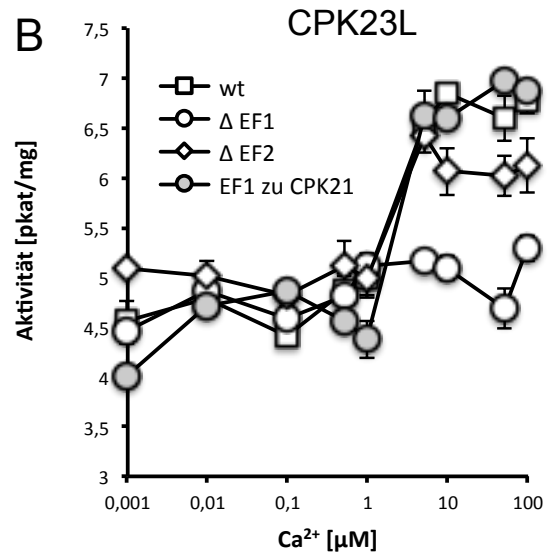
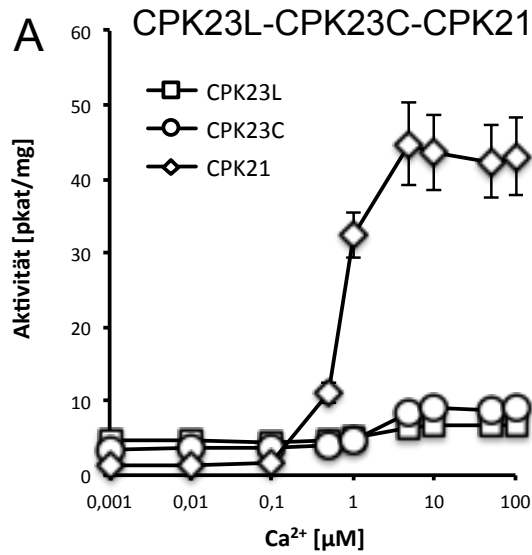


Abb. 3.7 Radioaktive Aktivitätsmessungen zur Bestimmung der Ca^{2+} abhängigen CPK Aktivierung

Die radioaktive Aktivitätsmessung wurde in einem 20 μl Ansatz mit 1 μg Proteinkinase sowie 1 μg Substrat und dem jeweiligen Calciumpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 1 mM EGTA, steigende freie Calciumkonzentration) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe 20%iger H_3PO_4 bzw. 10-fachen SDS Probenpuffer gestoppt. Jede Messung wurde mit 3 technischen Replikaten durchgeführt. Gemessen ist die Aktivität in pico-Katal pro mg eingesetzter Proteinkinase in Abhängigkeit der Calciumkonzentration in $[\mu\text{M}]$. Wenn nicht anders erwähnt, wurde als Substrat Casein verwendet. In A) sind die Aktivitätskurven der Proteine CPK23L (Quadrat), CPK23C (Kreis) und CPK21 (Diamant) aufgetragen. B) Darstellung der Aktivitätskurven der CPK23L (Quadrat) sowie CPK23L ΔEF1 (Kreis), CPK23L ΔEF2 (Diamant) sowie CPK23L EF1 zu CPK21 EF1 (grauer Kreis). C) Aktivitätskurven des CPK23C ΔEF1 (Quadrat), ΔEF2 (Kreis), ΔEF3 (Diamant), ΔEF4 (Dreieck) sowie CPK23C EF1 zu CPK21 EF1 (graues Quadrat). D) Aktivitätskurven von CPK21 ΔEF1 (Quadrat), ΔEF2 (Kreis), ΔEF3 (Diamant) und ΔEF4 (Dreieck). E) Aktivitätsmessung des CPK23L Proteins (Quadrat), CPK23L S386D (Diamant) sowie CPK23L Q393E (Kreis) Variante. E) Messung verschiedener Substrate der CPK23L Proteinkinase wie Casein (graues Quadrat), SLAH3-NT Aminosäure 1-257(Kreis), SLAC1-NT Aminosäure 1-186 (Diamant), ABI2 (Quadrat) und ABF2 (Dreieck).

Da schon in Abb. 3.7 A) eine deutlich stärkere Calciumaktivierung für CPK21 gemessen werden konnte, wiesen auch die in Abb. 3.7 D) untersuchten EF Hand Varianten dieses Proteins größere Unterschiede in ihrer Aktivität auf. So waren die EF Hand Varianten der ersten beiden EF Hände in ihrer Aktivität um das 5-fache auf etwa das Level von CPK23C reduziert, während die EF Hand Varianten von ΔEF3 und ΔEF4 weniger Einfluss auf die Aktivität des Proteins nahmen. In allen drei Abbildungen 3.7 B) bis D) wird offensichtlich, dass die erste EF Hand essentiell für die Aktivierung der Proteinkinasen durch Calcium ist. Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuresequenz dieser ersten EF Hand fallen zwei Besonderheiten auf. Zum einen liegt die in die Bindung des Calciumions involvierte Aminosäure Glutamin³⁹³ in CPK21 als Glutamat vor, was der Grund für die verringerte Affinität sein könnte. Zum anderen befindet sich innerhalb der ersten EF Hand Sequenz eine Autophosphorylierungsstelle Serin³⁸⁶ der CPK23L Proteinkinase (Wellmann, 2012; diese Arbeit Kapitel 3.3.1). Möglicherweise kann diese Phosphorylierungsstelle die Bindefähigkeit des Calciumions beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden CPK23L Varianten Glutamin³⁹³E und CPK23L Serin³⁸⁶D aus *E.coli* rekombinant gereinigt und im Aktivitätstest analysiert. Die daraus erhaltenen Kurven sind in Abb.3.7 E) zusammen mit der CPK23L Wildtyp Kurve aufgetragen. Wie aus dieser Abbildung zu erkennen ist, nahmen die Mutationen keinerlei Einfluss auf die calciumabhängige Aktivierung der CPK23L Proteinkinase und waren damit nicht der Grund für die abweichende calciumunabhängige Aktivität der CPK23L ΔEF1 . Ebenso unverändert sind die Aktivitätskurven in Abbildung 3.7 F) dargestellt. Diese zeigen die Aktivität der CPK23L Proteinkinase in Kombination mit unterschiedlichen endogenen Substraten. Um sicherzustellen, dass alle mit Casein durchgeführten calciumabhängigen Aktivitätstests auch in einer Pflanzenzelle stattfinden könnten, wurden unterschiedliche endogene Substrate der CPK23L Proteinkinase untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluss des Substrats auf die Calciumaffinität der Proteinkinase detektiert werden.

3.3 Phosphorylierungsstellen der Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion

Zu einer vollständigen *in vitro* Charakterisierung einer Proteinkinase gehört, neben oben gezeigten Experimenten, auch die massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen des Proteins. Die in dieser Arbeit gezeigten Phosphorylierungsdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Hippler der WWU Münster analysiert. Zur Messung der Phosphorylierungsstellen eines Proteins wurde dieses durch tryptischen Verdau in einzelne Peptide zerkleinert, welche in nachfolgender *immobilized metal affinity chromatography* aufgetrennt wurden. Dabei wurden phosphorylierte Peptide im Verhältnis zu unphosphorylierten angereichert und anschließend im Massenspektrometer analysiert. Mit Hilfe dieser Methode kann ein Protein auf Phosphorylierungsstellen untersucht werden. Die Phosphorylierung eines Proteins ist die häufigste posttranslationale Modifikation und wird zur Weiterleitung von Signalen verwendet. Dabei dient eine Proteinkinase als Katalysator der Übertragung eines γ -Phosphates des ATP Moleküls an die OH-Gruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin. Dies kann an der Proteinkinase selbst intramolekular oder intermolekular an bestimmten Substraten dieser Proteinkinase vollzogen werden. Durch Substratphosphorylierung wird meist dessen Eigenschaft verändert, sodass eine Regulation der Signalweiterleitung stattfindet. Durch *site-directed-mutagenesis* (SDM) der detektierten Phosphorylierungsstelle in ein Aspartat kann eine Mimikry des phosphorylierten Zustandes erreicht werden (Thorsness und Koshland, 1987; Marcus *et al.*, 1988; Kurland *et al.*, 1992). Der unphosphorylierte Zustand des Proteins wird durch eine Alanin-Substitution der Phosphorylierungsstelle simuliert. Der Einfluss der daraus entstehenden Varianten auf die ABA-Signaltransduktion kann sowohl *in vitro* durch radioaktive Proteinkinase-Aktivitätstests als auch in Protoplasten *in vivo* studiert werden. Eine Phosphorylierung ist generell jedoch kein fester Dauerzustand, sondern kann von Proteinphosphatasen wieder entfernt werden. Da im ABA-Rezeptorkomplex auch Proteinphosphatasen von großer Bedeutung sind, ist es interessant, deren Interaktion mit bestimmten Phosphorylierungsvarianten zu untersuchen. Hierbei hilft ein Proteinkinase-Aktivitätstest, da er es ermöglicht, dieses Protein-Potpourri *in vitro* zusammenzufügen und den Fokus auf verschiedene Komponenten zu lenken.

3.3.1 Autophosphorylierungsstellen der calciumabhängigen Proteinkinasen

Autophosphorylierungsstellen sind intramolekulare Phosphorylierungsstellen, die wichtige Hinweise zur eigenen, wie auch zur Regulation durch andere Komponenten, zum Beispiel weiteren Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen, liefern. Zur Messung dieser phosphorylierten Aminosäuren wurden die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und CPK21 mit nicht radioaktiven ATP inkubiert, um eine Autophosphorylierung zu gewährleisten und im Anschluss massenspektrometrisch analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3.8 als ein Sequenzalignment dieser Proteinkinasen dargestellt. Phosphorylierte Aminosäuren wurden in der Sequenz rot gekennzeichnet.

Um die Autophosphorylierungsstellen des Proteins auf ihre Relevanz einordnen zu können, ist es wichtig, sowohl die Domänenstruktur der CPK Proteine als auch die jeweilige Funktion der Domäne mit einzubeziehen (Abb. 1.6 B). Die Autophosphorylierungsstellen der jeweiligen Proteinkinasen sind im Sequenzalignment in Abb. 3.8 rot markiert und treten gehäuft im N-Terminus auf. Der N-Terminus der CPKs ist die meist variable Domäne der CPK Familie und für die Substratbindung und für die Lokalisation von größter Bedeutung (Martin und Busconi, 2000; Ito *et al.*, 2010). Durch ihre flexible Sekundärstruktur vermittelt diese Domäne Protein-Protein Interaktionen und damit die Funktion der CPK (Ito *et al.*, 2010). Zudem konnten bereits Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2013). Die Phosphorylierungsstellen der CPK23L, CPK23C und CPK21 im N-Terminus waren häufig an konservierten Serinen/Threoninen wie Serin⁶, Threonin¹¹ oder Threonin/Serin¹⁹ nachzuweisen (Abb. 3.8). Besonderes Augenmerk galt den zusätzlichen Aminosäuren des CPK21 Proteins 40 bis 52 mit Threonin⁴⁵ als Autophosphorylierungsstelle. Möglicherweise könnte in diesem Bereich der Grund für die unterschiedlichen Aktivitäten der Proteinkinasen liegen. Dafür würde sich aber auch der Bereich der Junction Domäne anbieten. Die Junction Domäne dient der inaktiven Proteinkinase als Pseudosubstrat und führt zur Autoinhibierung (Harper *et al.*, 1994). Diese könnte durch Autophosphorylierung an Serin³⁴³ oder Serin³⁶² innerhalb dieser Domäne beeinflusst oder gar aufgehoben werden. Weitere Autophosphorylierungen waren auch in der ersten EF Hand der Proteine zu beobachten, worunter Serin³⁸⁶ in CPK23L bereits untersucht wurde (Abb. 3.7 E). In der hoch konservierten Proteinkinase Domäne als auch in der Calmodulin-ähnlichen Domäne konnten nur vereinzelt Autophosphorylierungsstellen detektiert werden, was jedoch keine Aussage über ihre Relevanz treffen lässt.

3.3.2 Autophosphorylierungsstellen der OST1 Proteinkinase

Neben den calciumabhängigen Proteinkinasen CPK23 und CPK21 ist auch die Proteinkinase SnRK2.6 bzw. OST1 eine zentrale Komponente des ABA-Signalwegs (Mustilli *et al.*, 2002; Geiger *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2015) und in der Lage sich selbst, aber auch Substrate wie Transkriptionsfaktoren oder Ionenkanäle zu phosphorylieren (Abb 1.4). Dabei agiert diese Proteinkinase calciumunabhängig, da sie keine Calciumbindestellen aufweist, sondern nur zum größten Teil aus der Proteinkinase Domäne mit *activation loop* und C-terminalen Bindedomänen zur Protein Interaktion besteht. Zur Analyse der Autophosphorylierungsstellen von OST1, die vermutlich die Aktivität der Proteinkinase oder die Bindung von Interaktionspartnern beeinflussen können, wurde auch dieses Protein nach ATP-Inkubation massenspektrometrisch untersucht. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.9 A) als Primärsequenz des Proteins dargestellt. Phosphorylierte Aminosäuren wurden rot hervorgehoben.

A

```

MLDRPAVSGP MDLPIMHSD RYELVKDIGS GNFGVARLMR DKQSNELVAV KYIERGEKID 60
ENVKREIINH RSLRHPNIVR FKEVILTPTH LAIVMEYASG GELFERICNA GRFSEDEARF 120
FFQQLISGV S YCHAMQVCHR DLKLENTLLD GSPAPRLKIC DFGYSKSSVL HSQPKSTVGT 180
PAYIAPEVLL KKEYDGKVAD VWSCGVTLYV MLVGAYPFED PEEPKNFRKT IHRILNVQYA 240
IPDYVHISPE CRHLISRIFV ADPAKRISIP EIRNHEWFLK NLPADLMNDN TMTTQFDESD 300
QPGQSIEEIM QIIAEATVPP AGTQNLNHYL TGSLDIDDDM EEDLESDDLDD LDIDSSGEIV 360
YAM 363
    
```

B

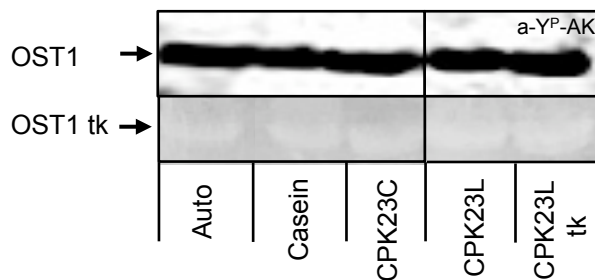


Abb. 3.9 Autophosphorylierungsstellen in OST1 sowie Nachweis der OST1 Tyrosin-Phosphorylierung

Die Analyse der Autophosphorylierungsstellen erfolgte anhand einer massenspektrometrischen Auswertung der phosphorylierten OST1 Proteinkinase und ist in Form der Primärsequenz dargestellt. Zur massenspektrometrischen Auswertung wurde 1 µg der OST1 Proteinkinase in einem 100 µl Ansatz mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂) und 2 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mittels 10-fachen SDS-Probenpuffers abgestoppt und das Protein auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die Bande der Proteinkinase ausgeschnitten, getrocknet und zur Analyse nach Münster versendet. A) Zur Veranschaulichung der erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden phosphorylierte Aminosäuren in der OST1 Primärsequenz rot hervorgehoben. Der Bereich des *activation loops* wurde in der Primärsequenz unterstrichen. Eine detaillierte Illustration der massenspektrometrischen Daten inklusive der Sequenzabdeckung befindet sich im Anhang. B) Western Blot des wie oben beschrieben phosphorylierten OST1 Proteins sowie einer inaktiven OST1 tk Version, detektiert über einen spezifischen anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (a-Y^P-AK, Sigma). Dieser Antikörper erkennt spezifisch das phosphorylierte Tyrosin, wohingegen unphosphorylierte Tyrosine nicht detektiert werden können. Neben diesem spezifischen Nachweis der OST1 Tyrosin-Phosphorylierung wurde zudem der Einfluss von Casein bzw. CPK23L/C auf diese Autophosphorylierung getestet.

In Abbildung 3.9 A) sind alle phosphorylierten Aminosäuren in der Primärsequenz von OST1 rot hervorgehoben. Betrachtet man die Verteilung der Autophosphorylierungsstellen wird deutlich, dass der größte Teil in der Kinase Domäne selbst lag, während am C-Terminus im Bereich der Interaktionsfläche keine Phosphorylierungen detektiert werden konnten. Eine besondere Häufung an Autophosphorylierungsstellen trat zwischen den Aminosäuren 160 – 186 auf, welche genau den *activation loop* der Kinase Domäne eingrenzen. Dort wurden rund 23% aller Aminosäuren phosphoryliert, darunter auch ein Tyrosin¹⁸³ konnte noch ein weiteres Tyrosin²⁴⁴ phosphoryliert gefunden werden. Da eine Tyrosin-Phosphorylierung bei einer

Serin/Threonin Proteinkinase durchaus ungewöhnlich ist und nur selten wie für die bispezifischen Proteinkinasen CPK4 und CPK34 (Oh *et al.*, 2012) nachgewiesen werden konnte, wurde zur Bestätigung der Tyrosin-Phosphorylierung ein spezifisch an phosphorylierten Tyrosin bindender Antikörper (α -Y^P-AK, Sigma) in einem Western Blot (Abb. 3.9 B) getestet. Dazu wurde das aktive OST1 Protein mit nicht radioaktiven ATP inkubiert und untersucht, ob verschiedene Substrate wie Casein oder andere Proteinkinasen wie CPK23L/CPK23C Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung nehmen. Als Negativ-Kontrolle diente derselbe Versuchsaufbau, jedoch mit inaktiver OST1 tk Proteinkinase. Wie aus diesem Western Blot ersichtlich, ist eine deutliche Bande des α -Y^P-Antikörpers zu erkennen, die in der Kontrolle mit inaktiven OST1 nicht detektiert werden konnte. Damit wurde eine Tyrosin Autophosphorylierung von OST1 bestätigt, die unabhängig von den verschiedenen getesteten Substraten war und auch nicht durch intermolekulare Phosphorylierung der CPK23 Proteinkinasen vorgenommen werden konnte.

Die besondere Lage des Tyrosins¹⁸³ im *activation loop* der OST1 Proteinkinase bildete die Grundlage zur Untersuchung der Relevanz dieser Tyrosin-Phosphorylierung für die Aktivität der Proteinkinase. Zu diesem Zweck wurden SDM Varianten Tyrosin¹⁸³ C, Tyrosin¹⁸³ T sowie Tyrosin¹⁸³ F kloniert und rekombinant aus *E.coli* gereinigt. Der Reinigungserfolg wurde mittels Western Blot bestätigt (Abb. 3.10 B) und die Varianten im radioaktivem Aktivitätstest analysiert (Abb 3.10 A). Dabei wurden die Varianten auf ihre Aktivität im Vergleich zum Wildtyp OST1 und einer inaktiven OST1 tk Proteinkinase untersucht. Aus der abgebildeten OST1 Aktivität wird deutlich, dass die Variante Tyrosin¹⁸³ C ebenso wie Tyrosin¹⁸³ T keine Aktivität im Vergleich zum Wildtyp OST1 zeigten. Allein die Substitution mit Phenylalanin Tyrosin¹⁸³ F führte zu einer 45%igen Restaktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass weder das Cystein noch das Threonin, welches theoretisch phosphoryliert werden könnte, diese Autophosphorylierungsstelle ersetzen konnte. Vermutlich war die Struktur des aromatischen Ringes von Phenylalanin dafür verantwortlich die Aktivität der OST1 Proteinkinase teilweise wieder herzustellen, wobei aber die OH-Gruppe des Tyrosins für die volle Aktivierung der Proteinkinase vermutlich notwendig ist.

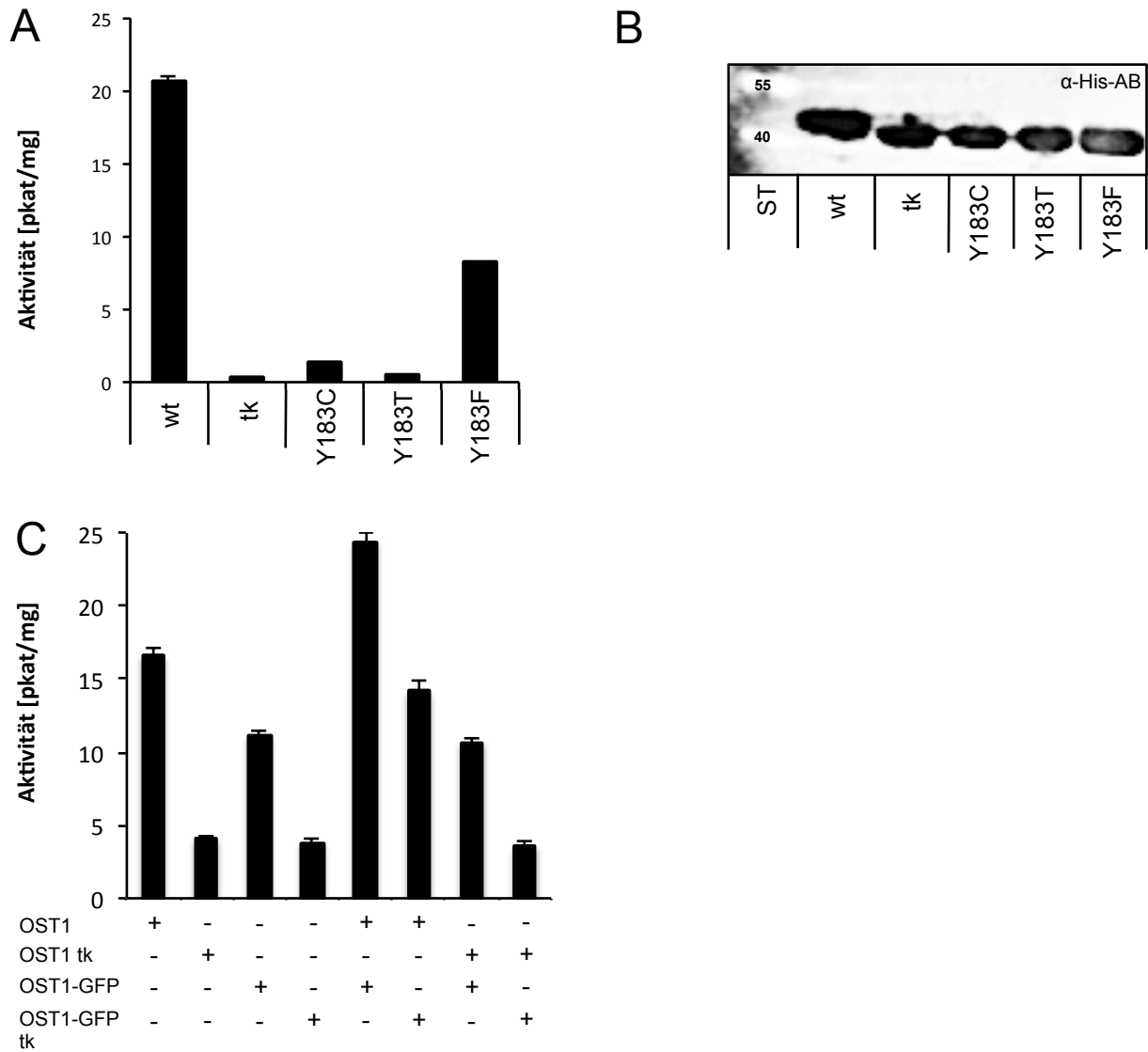


Abb. 3.10 Analyse der OST1 Tyrosin¹⁸³ Aktivität sowie Untersuchung der intermolekularen Phosphorylierung

Die radioaktive Aktivitätsmessung wurde in einem 20 µl Ansatz mit 1 µg Proteinkinase im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 µCi γ-³²P-ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT mittels 20%iger H₃PO₄ gestoppt. Jede Messung wurde mit 3 technischen Replikaten durchgeführt. Gemessen ist die Aktivität in pico-Katal pro mg eingesetzter Proteinkinase. In A) wurde die Aktivität der OST1 Varianten in pkat/mg dargestellt. Untersucht wurden von links nach rechts OST1 wt, OST1 tk, OST1 Y¹⁸³C, OST1 Y¹⁸³T und OST1 Y¹⁸³F. In Abbildung B) wurde die eingesetzte Proteinmenge mittels α-His-Antikörper überprüft. In C) wurde die OST1 Proteinkinase auf ihre intra- bzw. intermolekulare Phosphorylierung hin untersucht. Von links nach rechts wurde die Aktivität der OST1 wt, OST1 tk, OST1-GFP, OST1-GFP tk sowie deren Gemische untereinander in pkat/mg aufgetragen.

Nun stellt sich die Frage, ob dieses für die Aktivität essentielle Tyrosin¹⁸³ nur intramolekular phosphoryliert werden kann oder auch intermolekular von anderen Proteinkinasen. Aus oben durchgeführten Western Blot (Abb. 3.9 B) wurde bereits eine intermolekulare Phosphorylierung des Tyrosins durch CPK23L und CPK23C ausgeschlossen. Eine intermolekulare Phosphorylierung durch andere OST1 Proteinkinasen war aber durchaus denkbar. Aus diesem Grund wurden OST1-GPF Fusionsproteine sowohl als aktive als auch inaktive Version OST1 Aspartat¹⁴⁰ A (Geiger *et al.*, 2009) rekombinant aus *E.coli* gereinigt. Mit allen OST1 Proteinen OST1, OST1 tk, OST1-GFP sowie OST1 tk-GFP wurde ein Proteinkinase-Aktivitätstest durchgeführt (Abb. 3.9 C). In den ersten vier Balken wurde die reine Autophosphorylierung der Proteinkinasen aufgetragen, wobei OST1-GFP vermutlich aufgrund des GFP- Anhangs eine geringere Aktivität als der OST1 Wildtyp aufwies. In den darauffolgenden Ansätzen wurden die Proteinkinasen untereinander gemischt, um den Effekt einer intermolekularen Phosphorylierung zu beobachten. Für die Kombination von OST1/OST1 tk-GFP wurde jedoch die gleiche Aktivität detektiert wie für das OST1 Wildtyp Protein allein und *vice versa* für OST1-GPF/OST1 tk die gleiche Aktivität wie für OST1-GFP. Um aber genauere Aussagen über den intra- bzw. intermolekularen Phosphorylierungsstatus treffen zu können, wurde die präzisere Methode der massenspektrometrischen Analyse verwendet.

3.3.3 Intermolekulare Phosphorylierung zwischen CPK23L, CPK23C und OST1

Die Tragweite von intra- und intermolekularen Phosphorylierungen innerhalb des ABA-Signalwegs ist kaum bekannt und auch nur für einige Komponenten genauer untersucht worden (Geiger *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2011; Wellmann, 2012). Die bedeutendsten Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion sind SnRKs, CBL/CIPKs und CPKs, welche alle in der Regulation der ABA-Antwort beteiligt sind und auch untereinander interagieren können. So konnten Interaktionen zwischen OST1 und einigen CIPK und CBL Proteinen nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2013; Boudsocq und Sheen, 2013; Yoshida *et al.*, 2015). In Wellmann (2012) wurde eine Inhibierung von OST1 durch CPK23L gezeigt, indem eine OST1 spezifische Phosphorylierungsstelle eines ABF1 Peptids von OST1 nicht mehr phosphoryliert wurde, nachdem OST1 30 min mit CPK23L inkubiert wurde. Um genaue intermolekulare Phosphorylierungsstellen bestimmen zu können, wurden die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und OST1 sowohl als inaktive Proteinkinase als auch in Form eines aktiven GST-Fusionsproteins gereinigt. Zur Analyse der Phosphorylierungsstellen wurden je die inaktiven Proteinkinasen mit einer aktiven GST-Proteinkinase in verschiedenen Kombinationen miteinander getestet. Um sicherzustellen, dass nur intermolekulare Phosphorylierungen und keine Autophosphorylierung analysiert werden, wurden nur die Banden der inaktiven Versionen zur massenspektrometrischen Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 3.11 in Form von Primärsequenzen der Proteinkinasen abgebildet.

ERGEBNISSE

CPK23L tk

MGCFSSKHRK TQNDGGERTI PIIPVQTHIV DQVPTPSTPI SVRYPETILG KGKALGILGK 60
PFEDIRKFYS LGKELGRGGL GITYMCKEIS TGNNYACKSI LKRKLISEQG REDVKTEIQI 120
MQHLFGQPNV VEIKGAYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVSV 180
VQICHLKGI HRDLKPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKVYQDV AGSPYYVAPE 240
VLRRSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEIGIFDE ILKCEIDFVR EPWPSISESA 300
KDLVKMLTE DPKRRITAEQ VLEHPWIKGG EAPDKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKLLALK 360
VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEQLQTGLSR LRSRLSETEV QQLVEASDVD 420
NGTIDYYEF ISATMHRYKL HQDEHVHKAF QHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPPH 520

phosphoryliert durch: CPK23C; OST1; CPK23L+CPK23C; OST1+CPK23C; OST1+CPK23C+CPK23L; Auto

CPK23C tk

MGCFSSKHRK TQNDGGGERS IPIIPVQTHI VDQVPDHRKP QIPSPSIPIS VRDPETILGK 60
PFEDIRKFYS LGRELGRGGL GITYMCKEIG TGNIYACKSI LKRKLISELG REDVKTEIQI 120
MQHLGQPNV VEIKGSYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVDV 180
VQICHLNGVI HRDLKPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKIYKDV VGSPPYYVAPE 240
VLRQSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEEGVFVE ILKCKIDFVR EPWPSISSDSA 300
KDLVEKMLTE DPKRRITAAQ VLEHPWIKGG EAPEKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKLLALK 360
VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEQLQTGLSR LRSRLSETEV QQLVEASDVD 420
NGTIDYYEF ISATMHRYKL HHDEHVHKAF QHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPPH 520

phosphoryliert durch: CPK23C; Auto

OST1 tk

MLDRPAVSGP MDLPIMHDSD RYELVKDIGS GNFGVARLMR DKQSNELVAV KYIERGEKID 60
ENVKREIINH RSLRHPNIVR FKEVILTPTH LAIVMEYASG GELFERICNA GRFSEDEARF 120
FFQQLISGVS YCHAMQVCHR DLKLENTLLD GSPAPRLKIC DFGYSKSSVL HSQPKSTVGT 180
PAYIAPEVLL KKEYDGKVAD VWSCGVTLVY MLVGAYPFED PEEPKNFRKT IHRILNVQYA 240
IPDVYHISPE CRHLISRIFV ADPAKRISIP EIRNHEWFLK NLPADLMNDN TMTTQFDES 300
QPGQSIEEIM QIIAEATVPP AGTQNLNHYL TGSLDIDDDM EEDLESDDLDD LDIDSSGEIV 360
YAM 363

phosphoryliert durch: CPK23C; CPK23L+CPK23C; Auto

Abb. 3.11 Intermolekulare Phosphorylierungsstellen von CPK23L, CPK23C und OST1

Die Analyse der intermolekularen Phosphorylierungsstellen erfolgte anhand einer massenspektrometrischen Auswertung der phosphorylierten Proteinkinasen und ist in Form der Primärsequenzen dargestellt. Zur massenspektrometrischen Auswertung wurde 1 µg der inaktiven Proteinkinasen sowie 1 µg der aktiven GST-Versionen in einem 100 µl Ansatz mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 µM freies Calcium bzw. 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂ für OST1) und 2 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mittels 10-fachen SDS-Probenpuffers abgestoppt und das Protein auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die Bande der inaktiven Proteinkinase ausgeschnitten, getrocknet und zur Analyse nach Münster versendet. In den oben dargestellten Primärsequenzen der Proteinkinasen wurden phosphorylierte Aminosäuren fett hervorgehoben. Die in Abbildung 3.8 ermittelten Autophosphorylierungsstellen wurden unterstrichen. Blau markierte Aminosäuren wurden von CPK23C phosphoryliert, orange markierte von OST1. Wurden Aminosäuren von CPK23L und CPK23C phosphoryliert, sind sie pink markiert; die Kombination von Phosphorylierung durch OST1 und CPK23C grün. Wurde eine Aminosäure von allen drei Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und OST1 intermolekular phosphoryliert, ist sie rot dargestellt. Eine detaillierte Illustration der massenspektrometrischen Daten inklusive der Sequenzabdeckung befindet sich im Anhang.

Die Auswertung der massenspektrometrischen Analyse von CPK23L lieferte die meisten intermolekularen Phosphorylierungsstellen. Dabei war ein Großteil bereits durch die Analyse der Autophosphorylierung bekannt, wobei sich auch die Verteilung der Phosphorylierungsstellen auf den N-Terminus und die Junction Domäne ähnelten (Abb. 3.8). Besonders fielen die intermolekularen Phosphorylierungsstellen durch OST1 auf, welche im N-Terminus und auch am Ende der Kinase Domäne bzw. Anfang der Junction Domäne nachzuweisen waren und wovon nur zwei, Threonin¹⁹ und Serin³⁴³, Übereinstimmungen mit der Autophosphorylierung aufwiesen. Die Aminosäuren Threonin²⁷, Threonin³¹⁷ und Serin³⁹³ wurden allein von OST1 phosphoryliert und sind somit potentielle Phosphorylierungsstellen, welche die Interaktion und Aktivität von CPK23L durch OST1 beeinflussen könnten. Die Phosphorylierung von CPK23L durch CPK23C erfolgte ausschließlich an bereits bekannten Autophosphorylierungsstellen, wobei es auch zu einer Überlagerung mit Phosphorylierungsstellen durch CPK23L und OST1 kam, sodass manche Aminosäuren wie Serin³⁶⁵ und Threonin³⁸³ von allen getesteten Proteinkinasen phosphoryliert wurden. Bei der Analyse der intermolekularen Phosphorylierungsstellen von CPK23C konnte nur die Phosphorylierung durch CPK23C selbst ausgewertet werden. Dabei zeigten die intramolekularen und intermolekularen Phosphorylierungsstellen große Übereinstimmungen. Die massenspektrometrische Analyse der intermolekularen Phosphorylierungen an CPK23C durch CPK23L und OST1 ergaben keine auswertbaren Sequenzabdeckungen (siehe Anhang). Vergleicht man die intermolekularen Phosphorylierungsstellen von OST1 mit den intramolekularen Phosphorylierungsstellen, wurden Übereinstimmungen sichtbar. Jedoch wurden nur sieben der 14 Autophosphorylierungsstellen auch von den Proteinkinasen CPK23C und CPK23L intermolekular phosphoryliert. Dabei bestätigte sich das Ergebnis aus 3.9 B), dass Tyrosine nicht von den getesteten CPK Proteinkinasen phosphoryliert werden konnten. Neben den bisher bekannten Autophosphorylierungsstellen von OST1 wurden zwei weitere Phosphorylierungsstellen detektiert. Serin¹⁶⁸ wurde durch CPK23C phosphoryliert und Serin¹⁵² sogar von beiden getesteten CPK Proteinkinasen CPK23L und CPK23C. Eine Untersuchung dieser Phosphorylierungsstellen könnte Hinweise auf die intermolekulare Regulation der OST1 Proteinkinase durch CPK Proteinkinasen des ABA-Signalwegs liefern und den möglichen Einfluss auf die Substratphosphorylierung aufzeigen.

3.4 RCAR Proteine als Substrat der Proteinkinasen im ABA-Signalweg

Unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen erhöht sich die ABA-Konzentration in der Zelle, woraufhin eine Signalkaskade von Phosphorylierung und Dephosphorylierung ausgelöst wird. Dabei wird das ABA-Molekül von einem Rezeptorkomplex, bestehend aus einem RCAR Protein und einer PP2C Phosphatase, gebunden, wodurch die Phosphatase inaktiviert wird (Park *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). Die dadurch aktivierten Proteinkinasen des ABA-Signalwegs sind nun in der Lage sich selbst als auch Substratproteine zu phosphorylieren. Durch diese posttranslationale Modifikation kann die Eigenschaft des phosphorylierten Proteins verändert werden, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren aktiviert oder spezielle Ionenkanäle inhibiert (Geiger *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2005). Eine generelle Phosphorylierung von Komponenten der ABA-Signaltransduktion durch die agierenden Proteinkinasen konnte in vielen Fällen schon bewiesen werden. Welche speziellen Aminosäuren jedoch phosphoryliert wurden und welche Auswirkung diese Phosphorylierung auf die ABA-Signalweiterleitung nimmt ist dabei oft noch unklar. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, die im ABA-Signalweg involvierten Komponenten auf ihre Phosphorylierung durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 sowie OST1 hin zu untersuchen und den Einfluss einzelner Phosphorylierungsstellen zu bestimmen. Dabei startete die hier durchgeführte Analyse der einzelnen Komponenten beim ABA-Rezeptorkomplex und wurde bis zu den Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Der ABA-Rezeptorkomplex ist der Ausgangspunkt der ABA-Signaltransduktion, da durch ihn das ABA-Molekül gebunden und so die ABA-Konzentration in eine zelluläre Antwort übersetzt werden kann. Dabei besteht der ABA-Rezeptorkomplex aus zwei Komponenten, einem RCAR Protein und einer PP2C Phosphatase. Erstere werden im nachfolgenden Kapitel auf ihre Phosphorylierung durch die Proteinkinasen untersucht.

3.4.1 Analyse der RCAR Proteine als Substrat der Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1

Arabidopsis RCAR Proteine sind eine Proteinfamilie bestehend aus 14 Mitgliedern, die anhand ihrer Sequenzhomologie in 3 Untergruppen unterteilt werden (Raghavendra *et al.*, 2010). Dabei weisen alle RCAR Proteine in etwa das gleiche Molekulargewicht von rund 20 kDa auf und gehören durch ihre Sekundärstruktur zu der Bet v 1 Proteinfamilie (Ma *et al.*, 2009). Aufgrund von Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich wird der ABA Ligand sehr sensitiv von den RCAR Rezeptorproteinen wahrgenommen und gebunden, woraufhin sich der RCAR-PP2C Komplex bildet (Szostkiewicz *et al.*, 2010). Diese Komplexbildung ist ausschlaggebend für die weitere ABA-Signaltransduktion und Aktivierung von Proteinkinasen. Ob auch die RCAR Proteine als Substrate der so aktivierten Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1 dienen, wurde durch einen radioaktiven Aktivitätstest untersucht. Dazu wurden alle RCAR Proteine in getrennten Ansätzen mit den jeweiligen

Proteinkinasen in Anwesenheit von radioaktiven γ - ^{32}P -ATP inkubiert und anhand eines Autoradiogramms analysiert.

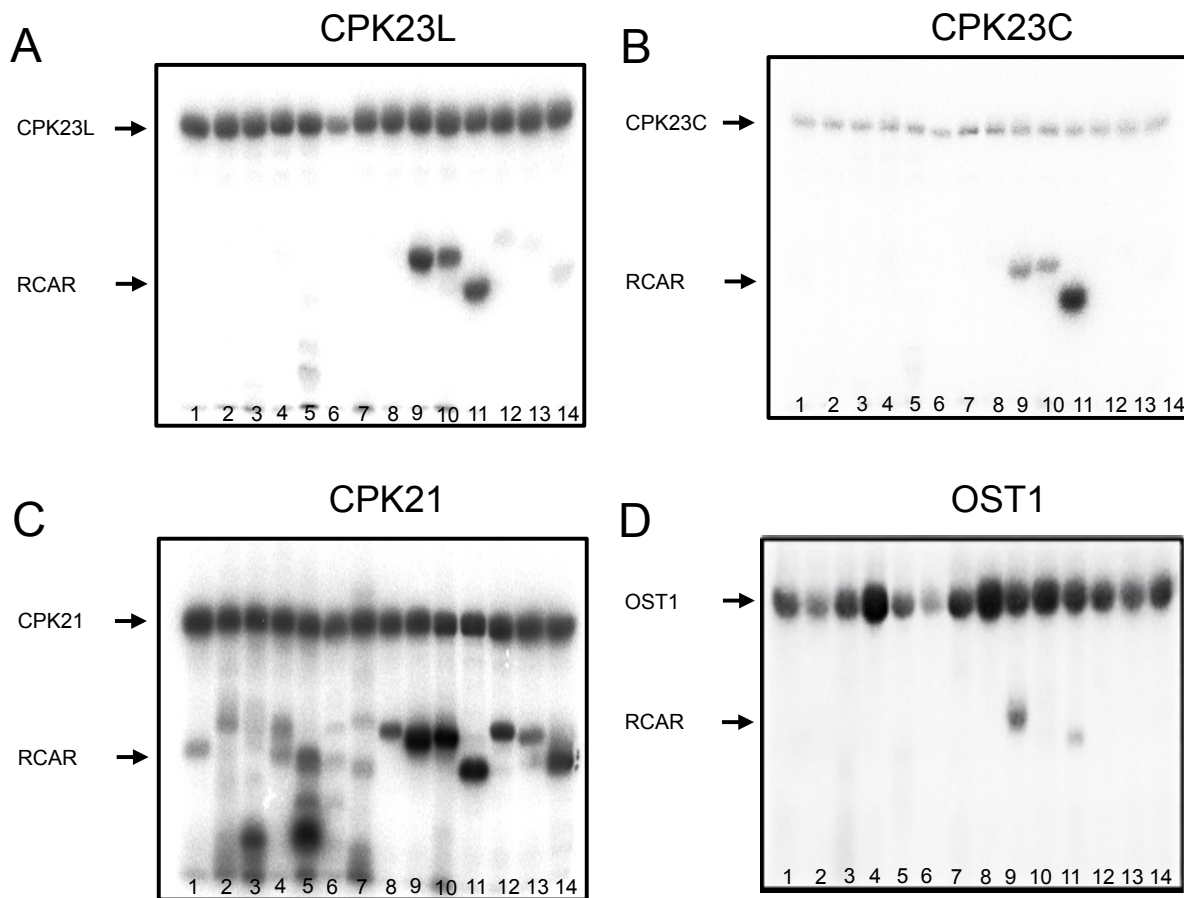


Abb. 3.12 Phosphorylierung der RCAR Proteine durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1

Darstellung der Autoradiogramme der RCAR Phosphorylierung durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1. In radioaktiven Aktivitätsmessungen wurden in einem 20 μl Ansatz 1 μg Proteinkinase mit 0,5 μg des jeweiligen RCAR Proteins im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 μM freies Calcium bzw. 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 3 mM MnCl_2 für OST1) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 μCi γ - ^{32}P -ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und dieses nach dem Gellauf getrocknet. Die Analyse aller Ansätze erfolgte nach einem Tag anhand des Phosphor-Imager BAS 1800. Autoradiogramm der Proteinkinasen A) CPK23L B) CPK23C C) CPK21 und D) OST1 mit allen 14 RCAR Proteinen; die Zahlen stehen für die Nummerierung der RCAR Proteine. Ein Coomassie-Gel der eingesetzten RCAR Proteinmengen ist im Anhang abgebildet.

Die oben abgebildeten Autoradiogramme zeigen deutliche Phosphorylierungsbanden sowohl von den Proteinkinasen (obere Bande) als auch von den darunter liegenden RCAR Proteinen (untere Banden). Bei der Betrachtung der Phosphorylierungssignale wurde deutlich, dass bestimmte Proteinkinasen nur einige RCARs phosphorylierten und sich somit selektiv unter den RCAR Proteinen unterscheiden konnten. So phosphorylierten CPK23L und CPK23C (Abb. 3.12 A und B) besonders

stark die RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11, wobei auch schwache Banden anderer RCAR Proteine sichtbar wurden. Generell wurde eine schwächere Phosphorylierung der RCAR Proteine durch die Inkubation mit OST1 detektiert (Abb. 3.12 D). Dennoch wurden auch hier die Proteine RCAR9 und RCAR11 präferiert. Im Gegensatz zu CPK23L, CPK23C und OST1 phosphorylierte CPK21 alle RCAR Proteine, jedoch auch mit unterschiedlicher Intensität (Abb 3.12 C). So wurden auch hier RCAR9, RCAR10 und RCAR11 bevorzugt als Substrat verwendet, da sie die stärksten Phosphorylierungssignale zeigten. Die Auswahl dieser drei RCAR Proteine warf Fragen auf, da sie zwar eine große Sequenzhomologie aufwiesen, RCAR11 jedoch in einer anderen Untergruppe unterteilt war als RCAR9 und RCAR10. Um Gemeinsamkeiten dieser Proteine oder sogar konservierte Phosphorylierungsstellen aufzudecken, wurden diese drei RCAR Proteine massenspektrometrisch untersucht.

3.4.2 Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11

Die Absättigung der Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11 erfolgte wie im Methodenteil beschrieben und die Proben wurden in Kooperation mit der Universität Münster im Massenspektrometer analysiert. Im Folgenden ist die Auswertung der Daten als Sequenzalignment der Primärsequenzen dieser Proteine dargestellt, wobei phosphorylierte Aminosäuren rot hervorgehoben wurden. Zur Vervollständigung wurde RCAR8 in das Alignment mit aufgenommen, da für dieses Protein eine veröffentlichte Proteinstruktur in der pdb-Datenbank hinterlegt ist und diese eine 3D-Anordnung der P-Stellen in RCAR9 und RCAR10 ermöglicht.

```

RCAR8      MRSPVQLQHGS---DATNGFHTLQPHDQTDGPIKRVCLTRGMH-VPEHVAMHHTHDVGPD 56
RCAR9      MPTSIQFQRSSTAAEAANATVRNYPHHHQK-QVQKVSILTRGMADVPEHVELSHTHVVGPS 59
RCAR10     ---MLAVHRPSS--AVSDGDSVQIPMMIASFQKRFPSLRDST-----AARFHTHEVGPN 50
RCAR11     MPSELTPEERS---ELKNS-----IAEFHTYQLDPG 28
           :  . . *      :.                               **: :. *.

RCAR8      QCCSSVVQMIHAPPESVWALVRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLHVGDLEVMVVVSGLP 116
RCAR9      QCFSSVVQDVEAPVSTVWSILSRFEHPQAYKHFVKSCHVVIGDGREVSVREVRVVSGLP 119
RCAR10     QCCSAVIQEISAPISTVWSVVRRFDNPQAYKHFLKSCVIGGDGDNVSLRQVHVVSGLP 110
RCAR11     SCSSLHAQRIHAPPELVSIVRRFDKPYKHFIKSVEQNFEMRVGCTRDVIVISGLP 88
           . * *   * : ** . **: : : ** : : : . ** * : * * : * * *

RCAR8      AVSSTERLEILDEERHVISFSVGGDHRLLKNYRSVTTLHASDDEG-----TVVVEYSIVD 171
RCAR9      AAFSLERLEIMDDDRHVISFSVGGDHRLLMNYKSVTTVHESEEDSDGKKRTRVVEYSVVD 179
RCAR10     AASSTERLDILDDERHVISFSVGGDHRLLSNYRSVTTLHPSPISG-----TVVVEYSVVD 165
RCAR11     ANTSTERLDILDDERRVTGFSIIGGEHRLTNYKSVTTVHRFEKEN--RIWTVVLESYVVD 146
           * * ** : : : : * . ** : : : * * : * * : * . . * * : * * : * *

RCAR8      VPPGNTTEETLSFVDTIVRCNLQSLARSTNRQ----- 203
RCAR9      VPAGNDKEETCSFADTIVRCNLQSLAKLAENTSKFS----- 215
RCAR10     VPPGNTKEETCDFVDVIVRCNLQSLAKIAENTA AESKKKMSL--- 207
RCAR11     MPEGNSEDDTRMFADTVVKLNQLKLATVAEAMARNSGDGSGSQVT 191
           : * ** : : : * * . . : * : * * : * * : :
    
```


Abb. 3.13 Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11

Die Analyse der Phosphorylierungsstellen erfolgte anhand einer massenspektrometrischen Auswertung der durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 phosphorylierten RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11 und ist in Form eines Sequenzalignments der RCAR-Primärsequenzen dargestellt. Zusätzlich wurde RCAR8 in das Sequenzalignment aufgenommen, um konservierte Aminosäuren der RCAR Untergruppe II zu verdeutlichen. Zur massenspektrometrischen Auswertung wurde 1 µg der RCAR Proteine mit 1 µg der jeweiligen Proteinkinase in einem 100 µl Ansatz mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 µM freies Calcium bzw. 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂ für OST1) und 2 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers abgestoppt und das Protein auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die jeweilige RCAR-Bande ausgeschnitten, getrocknet und zur Analyse nach Münster versendet. Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden anhand eines Sequenzalignments veranschaulicht. Rot markierte Aminosäuren zeigen die massenspektrometrisch gefundenen Phosphorylierungsstellen. Identische Aminosäuren sind durch ein (*) gekennzeichnet, sehr ähnliche Aminosäuren durch einen (:) sowie ähnliche Aminosäuren durch einen (.). Eine detaillierte Illustration der massenspektrometrischen Daten inklusive der Sequenzabdeckung befindet sich im Anhang.

Aminosäuren, welche anhand der massenspektrometrischen Analyse phosphoryliert detektiert wurden, sind in den abgebildeten Primärsequenzen rot hervorgehoben. Betrachtet man die Verteilung der Phosphorylierungsstellen über die gesamte Sequenz, fiel auf, dass der N-Terminus deutlich mehr Phosphorylierungsstellen aufwies, während im C-Terminus, der in die ABA-Bindung und PP2C Interaktion involviert ist, kaum Phosphorylierungen gefunden wurden. Zudem wurde deutlich, dass RCAR9 und RCAR10 in acht Positionen des Alignments übereinstimmende Phosphorylierungsstellen zeigten, während RCAR11 nur zwei Übereinstimmungen mit RCAR10 und keine mit RCAR9 erkennen ließ. Generell konnte man unter den Mitgliedern der Untergruppe II, RCAR9 und RCAR10, konservierte Phosphorylierungsstellen wie Serin¹¹⁶ für RCAR 9 und Serin¹⁰⁷ für RCAR10 oder auch Serin^{138/140} in RCAR9 und Serin^{129/131} in RCAR10 entdecken, welche auch in den nicht analysierten RCAR8 als Serin und damit als potentielle Phosphorylierungsstelle vorliegt. Neben diesen konservierten Stellen taten sich die starken Unterschiede im N-Terminus besonders hervor. Während Serin¹² in RCAR10 phosphoryliert vorlag, befand sich an gleicher Stelle in RCAR9 ein Alanin, welches auch als Substitution für eine unphosphorylierte Aminosäure verwendet werden kann. Eine ähnliche Konstellation wurde auch für Serin¹⁶, Serin²⁵ und Serin^{37/38} des RCAR10 Proteins detektiert. Um die Bedeutung dieser Unterschiede, aber auch der konservierten Phosphorylierungsstellen genauer untersuchen zu können, wurden SDM Varianten einiger Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10 und RCAR11 generiert, um diese im radioaktiven Aktivitätstests sowie in Protoplastenexperimenten auf ihre *in vivo* Funktion analysieren zu können.

3.4.3 Analyse der RCAR11 *phosphosite* Varianten im radioaktiven Kinase-Aktivitätstest

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses dieser posttranslationalen Modifikationsstellen wurden SDM *phosphosite* Varianten der RCAR Proteine im pQE70 Vektor erstellt. Für jede Phosphorylierungsstelle wurde ein Mimikry der nicht phosphorylierten Aminosäure in Form eines Alanins und als Phosphorylierungssubstitution eine Aspartat Variante verwendet. Leider ließen sich nur die Proteine der RCAR11 Varianten in ausreichenden Mengen reinigen, welche anschließend in einer radioaktiven Aktivitätsmessung als Substrat der CPK23L Proteinkinase getestet wurden.

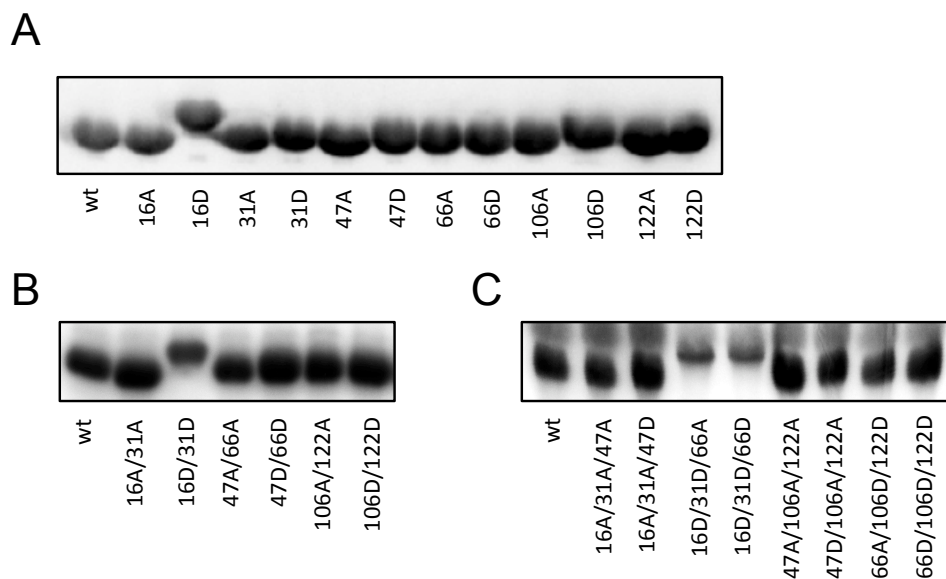


Abb. 3.14 Phosphorylierung der RCAR11 *phosphosite* Varianten durch CPK23L

Abbildung der Autoradiogramme der Phosphorylierung der RCAR *phosphosite* Varianten durch die Proteinkinase CPK23L. In radioaktiven Aktivitätsmessungen wurden in einem 20 µl Ansatz 1 µg Proteinkinase mit 0,5 µg des jeweiligen RCAR Proteins im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 µM freies Calcium) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 µCi γ-³²P-ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers gestoppt. Die Proben wurden im Anschluss auf ein Gel aufgetragen und dieses nach dem Gellauf getrocknet. Die Analyse aller Ansätze erfolgte nach einem Tag anhand des Phosphor-Imager BAS 1800. Autoradiogramm A) der RCAR11 Einzelmutationen, B) zeigt die Kombination der Mutationen 16/31A, 16/31D, 47/66A, 47/66D, 106/122A sowie 106/122D. In C) wurden diese Doppel-Mutationen um jeweils eine Mutation erweitert zu 16A/31A/47A, 16A/31A/47D, 16D/31D/66A, 16D/31D/66D, 47A/106A/122A, 47D/106A/122A, 66A/106D/122D sowie 66A/106D/122D.

In Abb. 3.14 sind die Phosphorylierungsbanden der unterschiedlichen RCAR11 *phosphosite* Varianten zu erkennen, die durch die CPK23L Proteinkinase phosphoryliert wurden. Dabei konnte kein Unterschied in der Intensität der Banden detektiert werden, jedoch war eine Verschiebung der Bande des RCAR11 Serin¹⁶ D Proteins im Gellauf zu erkennen. Diese Verschiebung ließ sich ebenso in der Analyse der Doppel-Mutanten und der Tripel-Mutanten detektieren (Abb. 3.14 B und C). In diesem *in vitro* Aktivitätstest konnte kein Einfluss der untersuchten Phosphorylierungsstellen von RCAR11 auf die Intensität der Substratphosphorylierung beobachtet werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Proteinkinase CPK23L und den RCAR11 *phosphosite* Varianten *in vivo* besteht. Aus diesem Grund wurden die im pQE70 Vektor hergestellten *phosphosite* Mutationen auch in den pSK Vektor eingebracht, um diese P-Mutationen im *in vivo* Protoplastensystem analysieren zu können.

3.4.4 *In vivo* Analyse der RCAR9, RCAR10 und RCAR11 *phosphosite* Mutationen

Zur *in vivo* Analyse der RCAR9, RCAR10 und RCAR11 *phosphosite* Mutationen und deren Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion wurde das am Lehrstuhl bewährte Protoplastensystem verwendet. Dazu wurden Col-0 Protoplasten, wie in den Methoden beschrieben, aus Arabidopsis Pflanzen gewonnen und mit DNA transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion sowie zum Auslesen der ABA-Antwort wurden 3 µg GUS-DNA respektive 9 µg LUC-DNA pro Ansatz verwendet. Von dem zu analysierenden Effektor wurden 3 µg DNA eingesetzt. Die Protoplastenansätze wurden nach der Transfektion geteilt und jeweils mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Nach einer Induktionszeit von bis zu 16 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität aller Ansätze am Luminometer bestimmt (Abb. 3.15).

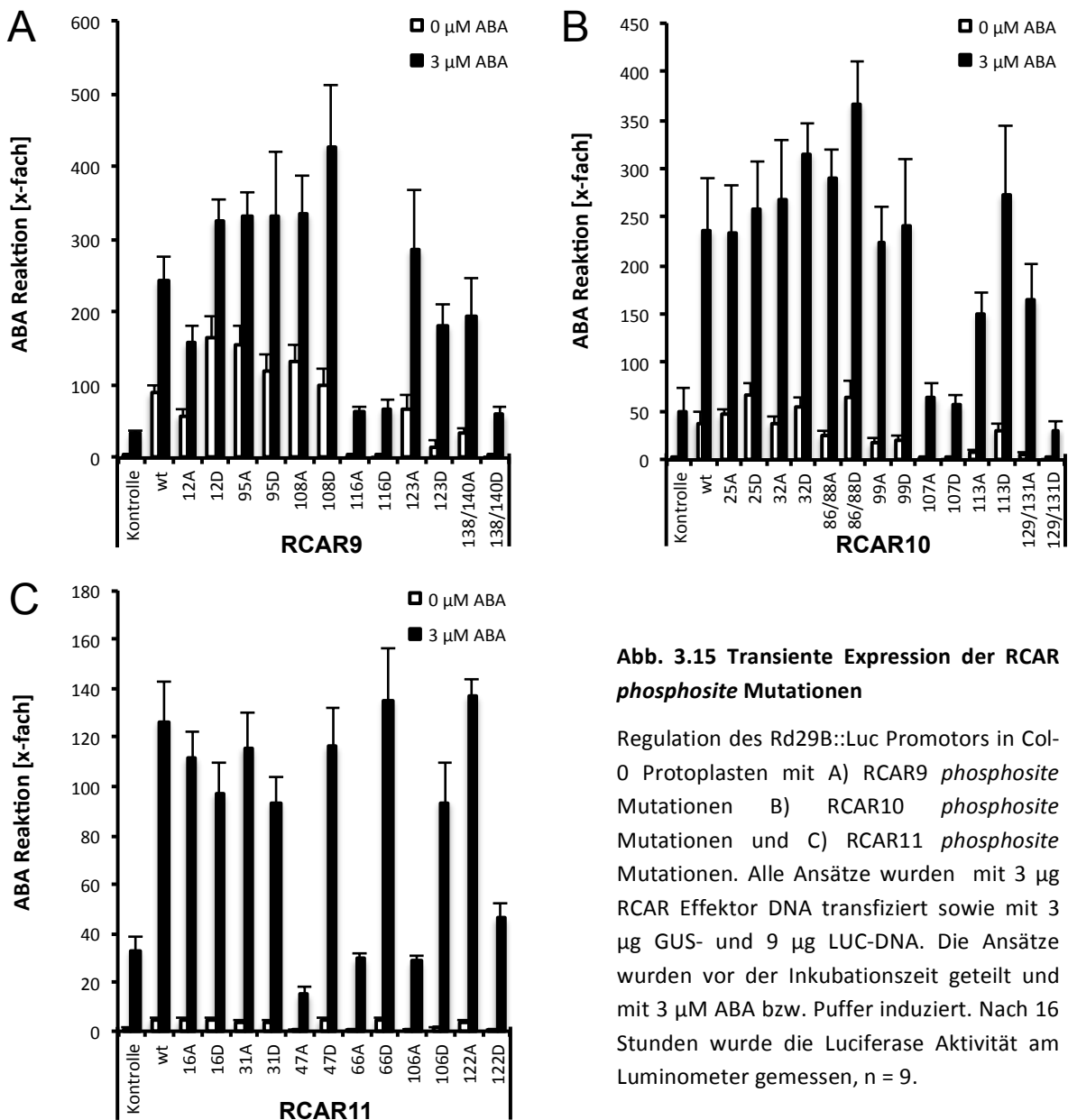


Abb. 3.15 Transiente Expression der RCAR *phosphosite* Mutationen

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten mit A) RCAR9 *phosphosite* Mutationen B) RCAR10 *phosphosite* Mutationen und C) RCAR11 *phosphosite* Mutationen. Alle Ansätze wurden mit 3 μg RCAR Effektor DNA transfiziert sowie mit 3 μg GUS- und 9 μg LUC-DNA. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 μM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 16 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 9.

Abbildung 3.15 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen RCAR *phosphosite* Mutationen auf die ABA-abhängigen Induktionswerte im transienten Protoplasten-Expressionssystem. Dabei bilden weiße Balken die Induktionswerte ohne ABA Zusatz ab, während schwarze Balken die Induktionswerte unter ABA Einfluss zeigen. In Abb. 3.15 A) sind die normierten Luciferase-Werte der RCAR9 *phosphosite* Mutationen dargestellt. Die Werte ohne RCAR9 Effektor DNA und der analysierten RCAR9 Wildtyp DNA bilden dabei einen Vergleichswert zu den getesteten *phosphosite* Mutationen. Ohne ABA wurde die ABA-Antwort des RCAR9 Wildtyp Proteins bereits 100-fach induziert, was sich durch Zugabe von 3 μM ABA um das 2,5 fache erhöhte. In diesem Bereich bewegten sich auch die

meisten untersuchten RCAR9 *phosphosite* Mutationen. Allein die Varianten des Serins¹¹⁶ in der A bzw. D Substitution sowie des Serins^{138/140} D fielen besonders durch ihre niedrigen Induktionswerte auf. In Anwesenheit von ABA wurde nur noch 25% der ABA-Antwort des Wildtyp Proteins detektiert, was in etwa dem Kontrollwert ohne RCAR9 entspricht. Ein ähnliches Bild ergibt sich in Abb. 3.15 B) bei der Analyse der RCAR10 *phosphosite* Mutationen. Auch hier wiesen die Mutationen der A bzw. D Substitution des Serins¹⁰⁷ sowie Serin^{129/131} D deutlich reduzierte Werte auf. Bereits in der Darstellung der Phosphorylierungsstellen der RCAR Proteine (Abb. 3.13) fielen diese Aminosäuren Serin¹¹⁶ bzw. Serin¹⁰⁷ sowie Serin^{138/140} bzw. Serin^{129/131} besonders ins Auge, da sie möglicherweise in der Untergruppe II der RCAR Familie konservierte Phosphorylierungsstellen darstellen, durch deren Phosphorylierungsstatus die ABA-Antwort reguliert werden könnte. Diese konservierten Phosphorylierungsstellen waren jedoch in der RCAR11 Phosphorylierung nicht zu erkennen. Aus diesem Grund war es nicht verwunderlich, dass auch die Induktionswerte von RCAR11 in Abb. 3.15 C) von RCAR9 und RCAR10 abwichen. Im Gegensatz zu RCAR9 und RCAR10 lagen die Absolutwerte der RCAR11 Wildtyp Induktion mit ABA deutlich unter den Werten dieser Proteine. Vergleicht man aber die RCAR11 Induktionswerte ohne und mit ABA untereinander, wurden größere Induktionszahlen erreicht. Im Fall vom Wildtyp RCAR11 bewirkt die Anwesenheit von ABA eine rund 25-fache Induktion der ABA-Antwort, die bei RCAR9 und RCAR10 nur etwa das 2,5-fache bzw. 5-fache betrug. Darüber hinaus wurden auch Unterschiede im Verhalten der Alanin- bzw. Aspartat-Substitutionen einiger *phosphosite* Mutationen deutlich. Während für RCAR9 Serin¹¹⁶ und RCAR10 Serin¹⁰⁷ geringere Werte, unabhängig der A- oder D-Substitution, gemessen wurden, war die Tatsache, ob es sich um eine Alanin- bzw. Aspartat-Substitution handelte bei RCAR11 von großer Bedeutung. In den Fällen der Mutationen von Serin⁴⁷ A, Serin⁶⁶ A und Threonin¹⁰⁶ A war ein massiver Rückgang der ABA-Antwort zu erkennen, während die Aspartat-Mutationen dieser Aminosäuren kaum Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen. Kontrovers dazu verhielt sich die Alanin-Substitution des Serin¹²² dem RCAR11 Wildtyp entsprechend, wohingegen die Aspartat-Substitution mit ABA nur noch 32% des Wildtyp Wertes erreichte. Die in den RCAR9, RCAR10 und RCAR11 abweichenden *phosphosite* Mutationen hatten allesamt gemein, dass sie negativ auf die ABA-Antwort wirkten. Eine Mutation, die den ABA-Signalweg positiv reguliert, konnte jedoch nicht detektiert werden.

Zur Verfeinerung dieser Ergebnisse wurden Titrationsen einiger herausragender RCAR *phosphosite* Mutationen, RCAR9 Serin¹¹⁶ D, RCAR10 Serin¹⁰⁷ D sowie RCAR11 Serin¹²² D, mit ansteigender Effektor-DNA-Konzentration durchgeführt. Dazu wurden SnRK2D/E *knockout* Protoplasten hergestellt, welche mit den GUS- bzw. LUC-Kontrollen sowie 3 µg OST1, 3 µg ABF2 und ansteigender RCAR-Effektor-DNA transfiziert wurden. Der positive Regulator OST1 und ABF2 wurden in Kombination bei der Titration verwendet um die Induktionswerte der ABA-Antwort zu maximieren, wodurch sich der Spielraum einer RCAR-induzierten Repression dieser ABA-Antwort erhöhte.

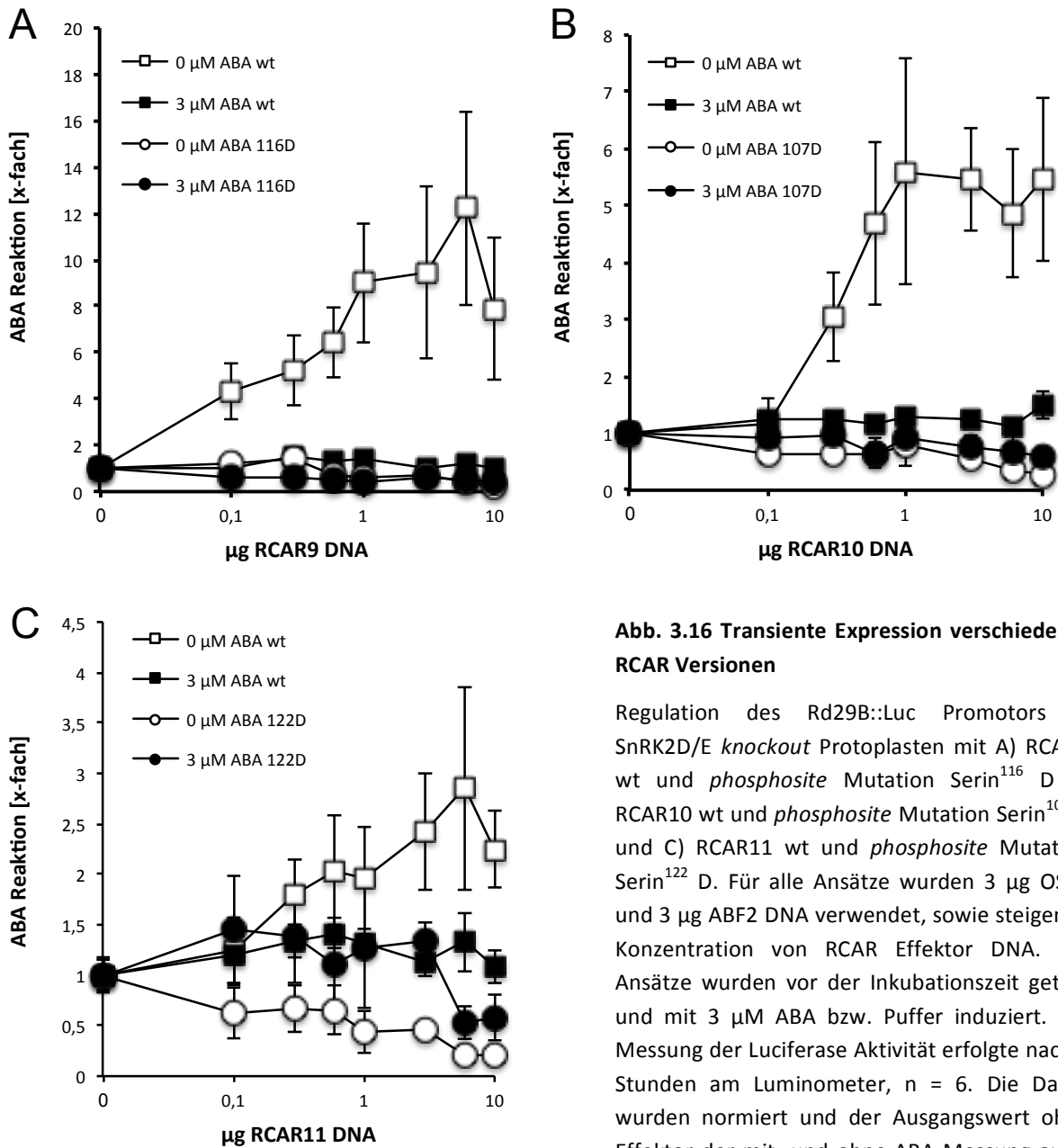


Abb. 3.16 Transiente Expression verschiedener RCAR Versionen

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in SnRK2D/E *knockout* Protoplasten mit A) RCAR9 wt und *phosphosite* Mutation Serin¹¹⁶ D B) RCAR10 wt und *phosphosite* Mutation Serin¹⁰⁷ D und C) RCAR11 wt und *phosphosite* Mutation Serin¹²² D. Für alle Ansätze wurden 3 µg OST1 und 3 µg ABF2 DNA verwendet, sowie steigende Konzentration von RCAR Effektor DNA. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Die Messung der Luciferase Aktivität erfolgte nach 6 Stunden am Luminometer, n = 6. Die Daten wurden normiert und der Ausgangswert ohne Effektor der mit- und ohne-ABA Messung auf 1 gesetzt.

In Abb. 3.16 A) ist die Titrationskurve der RCAR9 Serin¹¹⁶ D Mutante im Vergleich zum Wildtyp RCAR9 dargestellt. Während die ABA-Antwort der Wildtyp-DNA ohne ABA durch steigende RCAR9 Effektor DNA um das 10-fache induziert wurde, blieb eine Induktion mit ABA aus. Ebenso unverändert schwankten die Titrationskurven der RCAR9 Serin¹¹⁶ D Variante mit und ohne ABA nur minimal, ließen jedoch eine leicht negative Tendenz vermuten. Ähnlich verhielt es sich bei der Titration von RCAR10 in Abb. 3.16 B). Die Wildtyp Kurve ohne ABA stieg hier um das 5-fache, während der Wert mit ABA konstant blieb. Für die *phosphosite* Mutante RCAR10 Serin¹⁰⁷ D wurde mit steigender Effektor DNA ein leichter, ABA-unabhängiger Negativtrend detektiert. Wie bereits im vorherigem Protoplasten-Experiment beobachtet wurde, zeigte RCAR11 auch in dieser Analyse Unterschiede zu

RCAR9 und RCAR10 (Abb 3.16 C). Während die Werte für Wildtyp RCAR11 und Serin¹²² D mit ABA um den Wert 1 schwankten, verhielten sich Wildtyp und Serin¹²² D Mutante ohne ABA gegensätzlich. Der Wildtyp wies einen leichten Anstieg um das 2,5-fache auf, während die ABA-Antwort der Serin¹²² D Mutante aufgrund zunehmender Effektor-DNA gehemmt wurde. Eine mögliche Erklärung dieser Titrationskurven könnte in der Interaktion zwischen RCAR Proteinen und Proteinphosphatasen liegen. Ist die zelluläre ABA-Konzentration erhöht, ist das RCAR Protein an eine PP2C Phosphatase gebunden und inhibiert diese. Die Titrationskurven von RCAR9, RCAR10 und RCAR11 ohne ABA verlaufen konstant trotz steigender RCAR Effektor-Konzentration. Befindet sich die Zelle jedoch in einem stressfreien Zustand, ohne zelluläres ABA und somit aktiven Proteinphosphatasen, bewirkt die Zunahme des Wildtyp RCAR Proteins eine Steigerung der ABA-Induktion und fördert so die Stress-Antwort. Die Phosphorylierungsmimikry dieser RCAR Proteine können nicht von den aktiven Proteinphosphatasen dephosphoryliert werden und führen durch ihre Zunahme zu einer Verringerung der ABA-Antwort, was sich sehr deutlich an RCAR11 Serin¹²² D zu zeigte.

Daraufhin stellte sich die Frage, ob diese *phosphosite* Mutationen Auswirkungen auf das zweite im ABA-Rezeptorkomplex involvierte Protein einer PP2C Proteinphosphatase hat. Da sich die RCAR9 und RCAR10 Protein *phosphosite* Varianten im Gegensatz zu RCAR11 nicht rekombinant reinigen ließen, konnten für die entsprechenden RCAR11 Varianten Phosphatase-Aktivitätstest mit der PP2CA Phosphatase durchgeführt werden.

3.4.5 Untersuchung einiger RCAR11 *phosphosite* Varianten im Phosphatase-Aktivitätstest

Aufgrund der verringerten ABA-Antwort einiger im Protoplastensystem untersuchten RCAR Mutationen stellt sich die Frage, ob diese Reaktion auf eine veränderte RCAR-PP2C Interaktion zurückzuführen ist. Um dies zu untersuchen, wurden die vorher bestimmten RCAR11 Varianten Serin⁴⁷ A, Serin⁶⁶ A, Threonin¹⁰⁶ A sowie Serin¹²² D auf ihren Einfluss auf die Aktivität der PP2CA Proteinphosphatase im Phosphatase-Aktivitätstest überprüft. Dazu wurden RCAR11 Varianten als auch PP2CA, wie in den Methoden beschrieben, gereinigt und der Aktivitätstest nach Protokoll durchgeführt. Gemessen wurde hierzu die ABA-konzentrationsabhängige Inhibierung der PP2CA Phosphatase durch das jeweilige RCAR Protein (Abb. 3.17). Als Kontrolle diente die ABA-abhängige Inhibierungskurve von PP2CA durch das RCAR11 Wildtyp Protein.

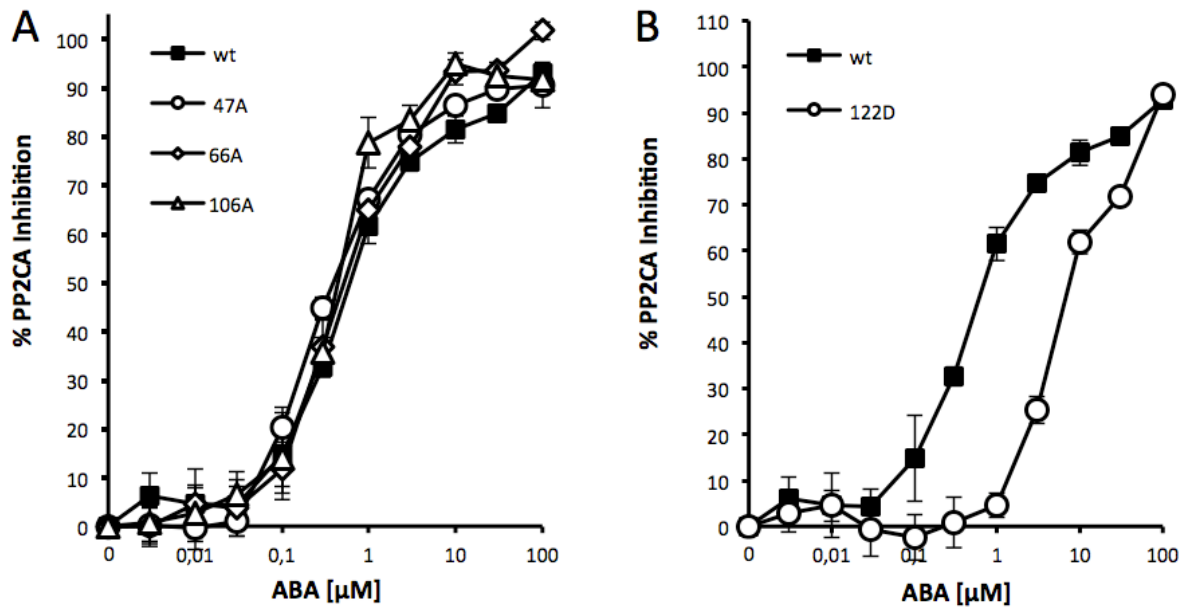


Abb. 3.17 PP2CA Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von ABA und verschiedener RCAR11 P-Varianten

In oben dargestellten Versuchen wurde eine ABA-abhängige Inhibierung des Umsatzes von MUP Substrat durch die PP2CA Proteinphosphatase gemessen. Dazu wurde 0,5 μg der PP2CA Proteinphosphatase mit 0,5 μg RCAR Protein und steigender ABA-Konzentration in Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,9, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,3 mM MnCl₂) 20 Minuten bei 35°C vorinkubiert. Ebenfalls 5 Minuten bei 35°C vorinkubiertes 2-faches MUP Substrat wurde in schwarze 96 Well Microtiterplatten überführt und mit selbem Volumen an vorinkubierten Ansatz versetzt. Im Anschluss erfolgte die Messung im PlateReader bei einer Anregung von 360 nm und Emission von 460 nm für 20 Minuten. Die beobachtete Inhibierung wurde in % gegen die ABA Konzentration in [μM] aufgetragen. Es wurden in A) RCAR11 Varianten Serin⁴⁷ A, Serin⁶⁶ A, Threonin¹⁰⁶ A sowie der wt analysiert, n = 8. In B) wurde die RCAR11 Variante Serin¹²² D und der RCAR11 wt abgebildet, n = 12.

In Abbildung 3.17 A) wurden die Inhibierungskurven von PP2CA in Anwesenheit der RCAR11 Varianten Serin⁴⁷ A, Serin⁶⁶ A, Threonin¹⁰⁶ A aufgetragen und mit der Messung des RCAR11 Wildtyp Proteins verglichen. Dabei konnten keine Veränderungen der PP2CA Inhibierung im Rahmen der typischen Messungenauigkeiten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, anders als bei der Messung der RCAR11 Serin¹²² D Variante in Abb. 3.17 B). Hier wurde eine gravierende Verschiebung der PP2CA Inhibierungskurve in Abhängigkeit von ABA detektiert. Statt des durchschnittlichen Wertes von 0,3 μM ABA des IC₅₀ Wertes von PP2CA wurde dieser Wert durch RCAR11 Serin¹²² D um das 10-fache auf rund 3 μM ABA verschoben. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Phosphorylierung des RCAR11 Proteins an Serin¹²² durch die Proteinkinasen des ABA-Signalwegs Einfluss auf den ABA-RCAR-PP2C Rezeptorkomplex nehmen könnte. In einem phosphorylierten Zustand von RCAR11 Serin¹²², wenn er Serin¹²² D entspricht, würde eine rund 10-fach höhere ABA-Konzentration benötigt werden, um die gleiche PP2CA Inhibierung zu erreichen wie in einem dephosphorylierten Zustand. Dadurch könnten die Proteinkinasen durch Übertragung einer Phosphatgruppe an diese Aminosäure die Inhibierung der PP2CA Phosphatase hinauszögern und somit auch die ABA-Signaltransduktion bis hin zu den Transkriptionsfaktoren beeinflussen.

3.5 ABF Transkriptionsfaktoren als Substrat der Proteinkinasen im ABA-Signalweg

ABFs sind sogenannte *ABA-responsive element binding proteins* und gehören zur Klasse A der bZIP Transkriptionsfaktoren (Finkelstein und Lynch, 2000). Diese in der ABA-Signaltransduktion involvierten Proteine regeln die ABA-abhängige Genexpression im Nukleus. Durch ihr Leucin-Zipper Motiv können ABFs an bestimmte DNA cis-Elemente binden, sogenannte ABREs (*abscisic acid responsive element*), und dadurch Promotoren gezielt aktivieren (Busk und Pages, 1998; Choi *et al.*, 2000). Unter osmotischen Stress und Trockenstress wird besonders die Expression von ABF1, ABF2 (AREB1), ABF3 sowie ABF4 (AREB2) deutlich induziert (Yoshida *et al.*, 2010). Ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls durch ABA im Nukleus akkumuliert und dort an ABREs binden kann, ist der ABF homologe Transkriptionsfaktor ABI5 (*ABA insensitive 5*) (Furihata *et al.*, 2006; Finkelstein *et al.*, 2005). Ein gemeinsames Merkmal dieser Transkriptionsfaktoren ist, dass erst die Phosphorylierung dieser Proteine die bedeutende posttranslationale Modifikation ist, welche zur Aktivierung führt (Kobayashi *et al.*, 2005). So wurde eine Phosphorylierung von ABF1 und ABF4 durch die calciumabhängigen Proteinkinasen CPK11 und CPK4 bereits nachgewiesen, welche dadurch positiv Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion nehmen (Zhu *et al.*, 2007). In vorherigen Dissertationen konnte ein Effekt der CPK23C Proteinkinase auf einige der Transkriptionsfaktoren im Protoplastensystem (Czap, 2015), sowie eine Phosphorylierung von ABF1 durch CPK23L nachgewiesen werden (Wellmann, 2012). In dieser Arbeit wurde diese Phosphorylierung genauer untersucht, wie auch weitere Proteinkombinationen mit einbezogen.

3.5.1 Analyse der ABFs als Substrat der Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1

Um einen detaillierteren Blick auf die ABA-Signaltransduktion werfen zu können, sind die Interaktionen zwischen den Proteinkinasen und den ABF Transkriptionsfaktoren dieses Signalwegs von großer Bedeutung. Dazu wurden die ABF Proteine ABF1, ABF2 (AREB1), ABF3, ABF4 (AREB2) sowie ABI5 als GST Fusionsproteine kloniert, gereinigt und als Substrat in einem radioaktiven Proteinkinase-Aktivitätstest eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde das GST Protein allein der Proteinkinase als Substrat angeboten sowie der SLAC1 N-Terminus (Aminosäure 1-186) als Positivkontrolle, da eine Phosphorylierung des SLAC1 Ionenkanals durch die Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1 bereits veröffentlicht wurde (Geiger *et al.*, 2009). Zur Auswertung wurden die Ansätze mit den Substraten GST, SLAC1, ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5 in dieser Reihenfolge auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels Laserscanner (Phosphor-Imager BAS 1800) ausgewertet.

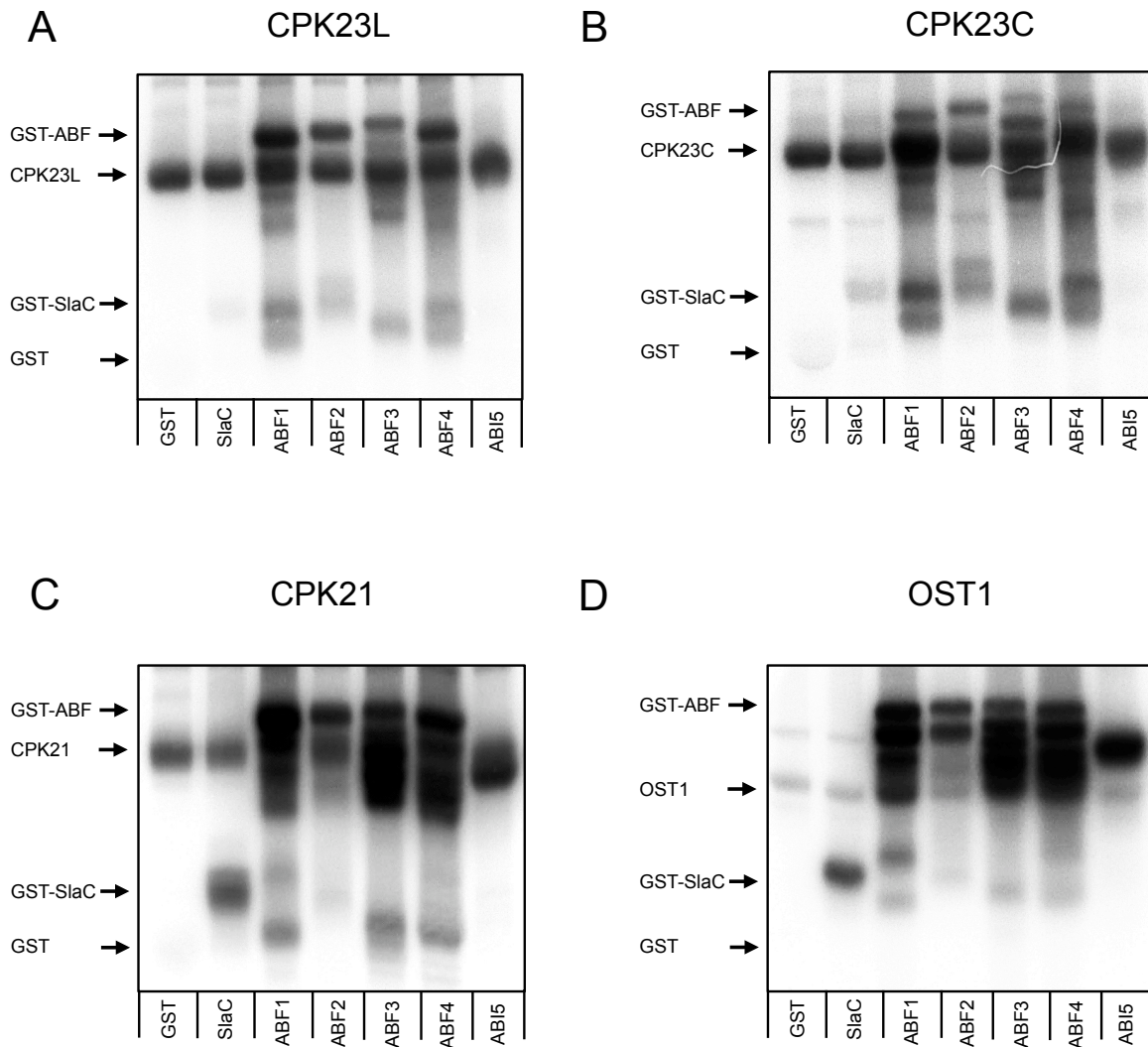


Abb. 3.18 ABF Phosphorylierung durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1

Abbildung der Autoradiogramme der Phosphorylierung der ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5 durch die Proteinkinase CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1. In radioaktiven Aktivitätsmessungen wurden in einem 20 µl Ansatz 1 µg Proteinkinase mit 1 µg des jeweiligen GST-ABF Proteins im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 µM freies Calcium bzw. 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂ für OST1) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 µCi γ-³²P-ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen und dieses nach dem Gellauf getrocknet. Die Analyse aller Ansätze erfolgte nach einem Tag anhand des Phosphor-Imager BAS 1800. Abgebildet sind die Autoradiogramme der durchgeführten Versuche. Von links nach rechts wurden die Substrate GST, SLAC N-Terminus Aminosäure 1-186, ABF1-GST, ABF2-GST, ABF3-GST, ABF4-GST sowie ABI5-GST verwendet. In A) wurden diese Substrate von CPK23L, in B) von CPK23C, in C) von CPK21 und in D) von OST1 phosphoryliert. Ein Western Blot von GST sowie der GST-Fusionsproteine befindet sich im Anhang.

In Abb. 3.18 A) wurde die Phosphorylierung der ABF Proteine durch die Proteinkinase CPK23L in einem Autoradiogramm anhand von übertragenen radioaktiven γ -³²P-Phosphaten sichtbar. Da die ABFs als GST Fusionsproteine vorlagen, wiesen diese ein höheres Molekulargewicht als CPK23L auf und waren so oberhalb der Autophosphorylierungsbande der Proteinkinase zu detektieren. Allein ABI5-GST lief im Gel auf Höhe der Proteinkinase, sodass dessen Phosphorylierung nur anhand des Intensitätsunterschiedes der Bande bestimmt werden konnte. In der ersten Spur des Autoradiogramms wurde die GST Negativ-Kontrolle aufgetragen, die keine Phosphorylierung durch CPK23L aufwies. Die verwendete Positiv-Kontrolle des SLAC1 N-Terminus in Spur zwei wurde nur sehr schwach von CPK23L phosphoryliert. Eine offensichtliche Phosphorylierung der ABF Proteine durch CPK23L konnten in den nachfolgenden Spuren durch die deutlichen Phosphorylierungsbanden oberhalb der Autophosphorylierungsbande der Proteinkinase nachgewiesen werden. In der Spur des ABI5 Transkriptionsfaktors wurde eine stärkere Phosphorylierungsbande detektiert als in der ersten Spur für die reine Autophosphorylierung von CPK23L. Ein sehr ähnliches Bild ergab sich in Abb. 3.18 B) für das Autoradiogramm der CPK23C Proteinkinase mit den getesteten Substraten. Obwohl die Substrate schwächere Phosphorylierungsbanden zeigten als in Abb. 3.18 A), konnte eine direkte Substratphosphorylierung durch CPK23C an den Transkriptionsfaktoren bestätigt werden. Sowohl die potente Proteinkinase CPK21 als auch die SnRK2 Proteinkinase OST1 phosphorylierten alle angebotenen Substrate, bis auf die GST Negativ-Kontrolle, was durch die intensiven Phosphorylierungsbanden des Autoradiogramms veranschaulicht wird (Abb. 3.18 C und D).

Anhand dieses Versuches konnten alle getesteten ABF Transkriptionsfaktoren als *in vitro* Substrate der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 des ABA-Signalwegs bestätigt werden. Nach der Identifizierung als endogenes Substrat wurden auch diese Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse auf ihre Phosphorylierungsstellen durch die Proteinkinasen hin untersucht.

3.5.2 Phosphorylierungsstellen der ABF Proteine ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5

Zur Analyse der genauen Phosphorylierungsstellen der ABF Transkriptionsfaktoren wurden diese durch kaltes ATP und Inkubation mit den Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion phosphoryliert und im Anschluss in Kooperation der WWU Münster massenspektrometrisch untersucht. Die daraus hervorgegangenen Phosphorylierungsstellen wurden in einem Sequenzalignment der ABF Primärsequenzen dargestellt (Abb. 3.19).

Abb. 3.19 Phosphorylierungsstellen der ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5

Die Analyse der Phosphorylierungsstellen erfolgte anhand einer massenspektrometrischen Auswertung der durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 phosphorylierten ABF Proteine ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5 und ist in Form eines Sequenzalignments der ABF-Primärsequenzen dargestellt. Zur massenspektrometrischen Auswertung wurde 1 µg der ABF Proteine mit 1 µg der jeweiligen Proteinkinase in einem 100 µl Ansatz mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 µM freies Calcium bzw. 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂ für OST1) und 2 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers abgestoppt und das Protein auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die jeweilige ABF-Bande ausgeschnitten, getrocknet und zur Analyse nach Münster versendet. Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden anhand eines Sequenzalignments veranschaulicht. Rot markierte Aminosäuren zeigen die massenspektrometrisch gefundenen Phosphorylierungsstellen. Identische Aminosäuren sind durch ein (*) gekennzeichnet, sehr ähnliche Aminosäuren durch einen (:), sowie ähnliche Aminosäuren durch einen (.) . Grau hinterlegte Bereiche markieren konservierte Bereiche, ein blauer Hintergrund zeigt die DNA-Bindedomäne mit darauffolgender grün markierter Leucin-Zipper Region. Mögliche Phosphorylierungsstellen der Casein Proteinkinase II sind durch + , der *calmodulin-dependent protein kinase II* durch # gekennzeichnet (Choi *et al.*, 2000). Eine detaillierte Illustration der massenspektrometrischen Daten inklusive der Sequenzabdeckung befindet sich im Anhang.

Durch die Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion phosphorylierte Aminosäuren wurden im Sequenzalignment der ABF Primärsequenzen rot hervorgehoben. Betrachtet man die Verteilung der P-Stellen innerhalb des Proteins, erkennt man eine klare Anhäufung von phosphorylierten Aminosäuren im ersten konservierten Bereich der Transkriptionsfaktoren (graue Box), während im C-Terminus, dort besonders in der DNA Bindedomäne (blaue Box), keine P-Stellen detektiert wurden. Die restlichen P-Stellen liegen gleichmäßig über das Protein verstreut. Bei genauerer Betrachtung des ersten konservierten Bereiches fällt die Dichte der Phosphorylierungsstellen auf, welche für ABF1 bei 35 % dieser konservierten Aminosäuren lag. Die konservierten Aminosäuren ABF1 Serin²⁸ und ABF1 Threonin³³ konnten auch in den anderen analysierten Transkriptionsfaktoren phosphoryliert detektiert werden, wovon das Serin auch eine potentielle Phosphorylierungsstelle der *Calmodulin-dependent protein kinase II* sowie das Threonin eine vorausgesagte Phosphorylierungsstelle der Casein Proteinkinase II waren (Choi *et al.*, 2000; Furihata *et al.*, 2006). Ebenso verhält es sich zu den stark konservierten und phosphorylierten Aminosäuren ABF1 Serin⁵⁰ sowie ABF1 Threonin¹³⁵, wovon letztere wiederum eine potentielle Phosphorylierungsstelle der *Calmodulin-dependent protein kinase II* darstellt. Neben diesen auffallend ähnlichen P-Stellen befinden sich jedoch auch viele P-Stellen der Transkriptionsfaktoren in weniger konservierten Bereichen wie dem N-Terminus oder den Glutaminreichen Regionen. Inwieweit diese Phosphorylierungsstellen Einfluss auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren und damit auf die ABA-Signaltransduktion nehmen, sollte durch *in vivo* Analysen im Protoplastensystem festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden markante Phosphorylierungsstellen von ABF1, ABF2 und ABF3 herausgesucht und diese mittels SDM verändert.

3.5.3 *In vivo* Analyse der ABF1, ABF2 und ABF3 *phosphosite* Mutationen

Wie für die vorher analysierten RCAR Proteine wurden auch für die ABF Transkriptionsfaktoren Mimikry Varianten durch SDM Mutation in pSK Vektoren generiert, um diese *in vivo* im Protoplastensystem auf ihren Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion zu untersuchen. Dazu wurden Col-0 Protoplasten, wie in den Methoden beschrieben, vorbereitet und mit 3 µg GUS DNA, 9 µg LUC DNA und 3 µg ABF Effektor DNA transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Ansätze aufgeteilt und jeweils mit Puffer bzw. mit 3 µM ABA induziert. Die Messung der Luciferase-Werte fand nach 16 Stunden Inkubation bei 22 °C und Dauerlicht statt.

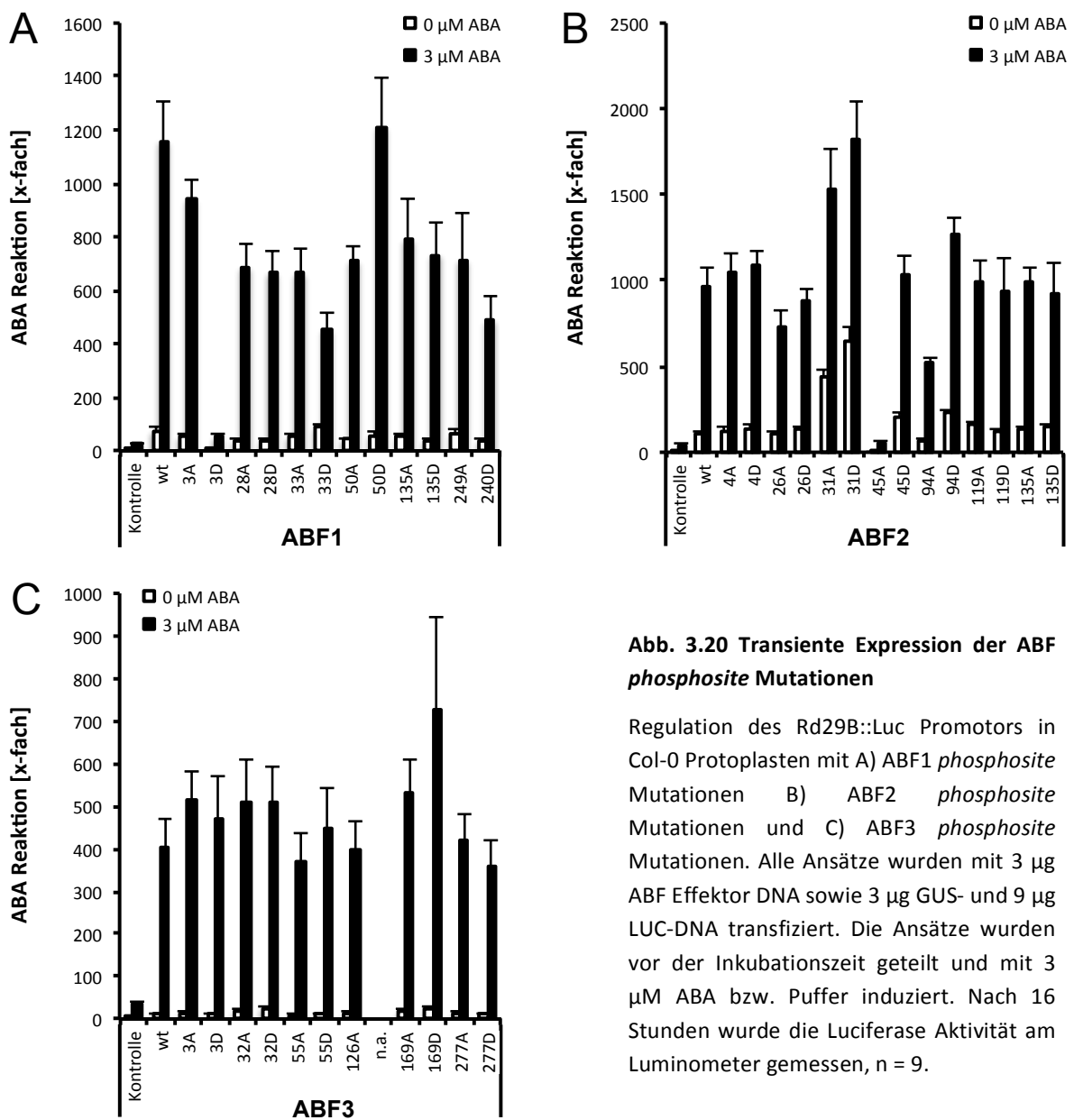


Abb. 3.20 Transiente Expression der ABF *phosphosite* Mutationen

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten mit A) ABF1 *phosphosite* Mutationen B) ABF2 *phosphosite* Mutationen und C) ABF3 *phosphosite* Mutationen. Alle Ansätze wurden mit 3 µg ABF Effektor DNA sowie 3 µg GUS- und 9 µg LUC-DNA transfiziert. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 16 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 9.

Abbildung 3.20 zeigt die Wirkung aller analysierten ABF *phosphosite* Mutationen auf die Induktionswerte der ABA-Antwort im Protoplastensystem. Dabei stellen weiße Balken gemessene Induktionswerte ohne ABA dar, während Werte mit ABA als schwarze Balken aufgetragen wurden. In Abb. 3.20 A) sind die Induktionswerte der ABF1 P-Varianten Threonin³, Serin²⁸, Threonin³³, Serin⁵⁰, Threonin¹³⁵ sowie Threonin²⁴⁰ aufgetragen. Neben der Kontrolle ohne ABF1 wurde der ABF1 Wildtyp ebenfalls gemessen. Dieser zeigte ohne ABA Induktionswerte von 100-fach, während mit ABA ein Wert von rund 1200-fach und somit eine 12-fache ABA-abhängige Induktion erreicht wurde. Vergleicht man diese Wert mit den *phosphosite* Mutanten, wird deutlich, dass alle ABF1 P-Varianten, mit Ausnahme von ABF1 Serin⁵⁰ D, eine geringere ABA-Antwort als der Wildtyp induzierten. Besonders auffällig war die Phosphorylierungssubstitution an der Aminosäure Threonin³ zu Asparat. Diese wies, sowohl ohne als auch mit ABA, nur marginale Induktionswerte auf, was auf eine mögliche Inhibierung der ABA-Antwort aufgrund einer Phosphorylierung an dieser Aminosäure schließen lässt. In Abb. 3.20 B) wurden die gemessenen Induktionswerte des ABF2 Wildtyps als auch der ABF2 P-Varianten Serin⁴, Serin²⁶, Threonin³¹, Serin⁴⁵, Serin⁹⁴, Serin¹¹⁹ sowie Threonin¹³⁵ dargestellt. Der mitgeführte Bezugswert der ABF2 Wildtyp Induktion ähnelte stark den Werten von ABF1, erreichte jedoch nur eine 10-fache ABA-abhängige Induktion. Unter den ABF2 *phosphosite* Mutanten stechen besonders zwei Aminosäuren, Threonin³¹ sowie Serin⁴⁵, heraus. Zum einen wurde für die Threonin³¹ A- und D-Substitution eine positive Regulation der ABA-Antwort detektiert, die unabhängig von ABA zu sein schien, da bereits die Induktionswerte ohne ABA eine bis zu 500 fache Induktion aufwiesen. Zum anderen wurde durch Serin⁴⁵ A ein starker negativer Regulator der ABA-Antwort entdeckt, wobei eine deutliche Diskriminierung zwischen den Phosphorylierungssubstitutionen an Serin⁴⁵ stattfand, da Serin⁴⁵ D eine dem ABF2 Wildtyp entsprechende ABA-Antwort induzierte. In einer abgeschwächten Form konnte dies auch für die ABF2 P-Variante Serin⁹⁴ nachgewiesen werden. Die restlichen ABF2 P-Varianten zeigten ein dem ABF2 Wildtyp entsprechendes Verhalten. Die Betrachtung der ABF3 Induktionswerte des Wildtyps und der P-Varianten Serin³, Serin³², Serin⁵⁵, Doppelmutante Serin¹²⁶/Threonin¹²⁸, Threonin¹⁶⁹ und Threonin^{277/278}, abgebildet in Abb. 3.20 C), lässt einen Unterschied zu ABF1 und ABF2 erkennen. Generell wurden durch Zugabe des ABF3 Effektors geringere Absolutwerte der ABA-Antwort gemessen. Beachtet man jedoch die ABA-abhängige Induktion dieser Werte, konnte eine 40-fache Steigerung der ABF3 Werte durch ABA nachgewiesen werden. Für ABF3 konnten nicht alle *phosphosite* Mutanten untersucht werden, da sich die Doppelmutante Serin¹²⁶/Threonin¹²⁸ D trotz mehrfacher Klonierungsversuche nicht herstellen ließ. Die restlichen P-Varianten zeigten im *in vivo* PP-Experiment nur marginale Abweichungen zu den Wildtyp ABF3 Induktionswerten. Allein Threonin¹⁶⁹ ließ eine leichte positive Regulation der ABA-Antwort erkennen.

Durch die oben erläuterte *in vivo* Analyse der ABF P-Varianten konnten einige relevante ABF P-Stellen wie ABF1 Threonin³ D, ABF2 Threonin³¹ sowie ABF2 Serin⁴⁵ A bestimmt werden. Ob weitere ABF P-Stellen bedeutend für die ABF-Proteinkinase Interaktion sind, sollte in nachfolgenden PP-Experimenten untersucht werden. Dazu wurden, wie vorhergehend beschrieben, Col-0 Protoplasten vorbereitet und neben den GUS und LUC Kontrollen mit je 3 µg ABF und Proteinkinase DNA transfiziert. Bei der Analyse der CPKs in Protoplasten gilt es zu beachten, dass nur die um die Calmodulin-ähnliche Domäne verkürzten Proteinkinasen aktiv sind. Da die cytosolische Calciumkonzentration in Protoplasten niedrig ist und nicht regulieren werden kann, liegen die Proteine in voller Länge in einem inaktiven Zustand vor (Sheen, 1996; Romeis *et al.*, 2001). Unter Verwendung der verkürzten CPK Versionen wurde nacheinander der Effekt der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 auf die ABA Induktionswerte der ABF P-Varianten untersucht.

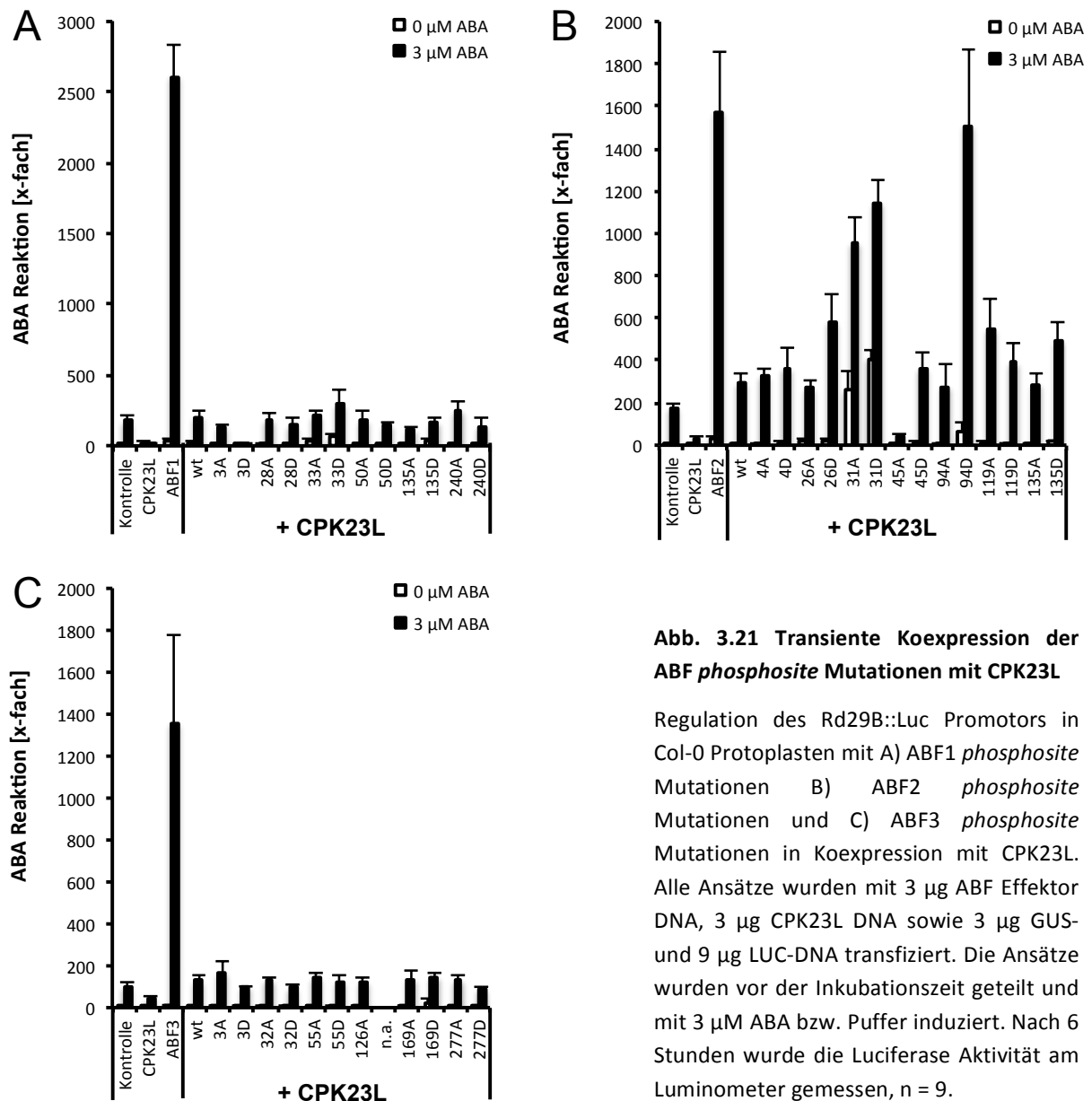


Abb. 3.21 Transiente Koexpression der ABF *phosphosite* Mutationen mit CPK23L

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten mit A) ABF1 *phosphosite* Mutationen B) ABF2 *phosphosite* Mutationen und C) ABF3 *phosphosite* Mutationen in Koexpression mit CPK23L. Alle Ansätze wurden mit 3 µg ABF Effektor DNA, 3 µg CPK23L DNA sowie 3 µg GUS- und 9 µg LUC-DNA transfiziert. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 9.

In Abbildung 3.21 A) wurde die Wirkung der CPK23L Proteinkinase auf die ABF1 Regulation der ABA-Signaltransduktion untersucht. Dabei wurden die Induktionswerte ohne ABA durch weiße Balken abgebildet, während schwarze Balken die Induktionswerte in Anwesenheit von ABA zeigen. Um Bezugswerte der Induktion zu schaffen, wurde die CPK23L Proteinkinase sowie der ABF1 Transkriptionsfaktor getrennt transfiziert und deren Induktionswerte, neben der Kontrolle, in den ersten Balken der Abbildung dargestellt. Die darauf folgenden Balken zeigen den Einfluss der CPK23L Proteinkinase auf die Induktionswerte der ABF1 *phosphosite* Mutanten durch die Koexpression beider Komponenten in einem Ansatz. Im Gegensatz zu den Induktionswerten von ABF1 allein bewirkte die Koexpression mit CPK23L eine deutliche Reduktion der ABA-Antwort um den Faktor 10. Nachfolgend werden die Kotransfektionen von CPK23L mit den ABF1 P-Varianten untereinander verglichen. Dabei stach die bereits im vorherigen Experiment auffällige ABF1 Threonin³ D Variante auch in dieser Messung heraus, da sie die Induktion der ABA-Antwort auf ein Minimum reduzierte. Eine leicht erhöhte ABA-Induktion, im Vergleich zum Wildtyp, wurde durch Kotransfektion der ABF1 Threonin³³ D Variante erkennbar. Bei der Analyse der restlichen koexprimierten ABF1 *phosphosite* Mutanten konnten nur leichte Schwankungen um den Induktionswert des koexprimierten ABF1 Wildtyps festgestellt werden. In Abbildung 3.21 B) ist die Analyse der Proteinkombination CPK23L mit ABF2 P-Varianten dargestellt. Wie für ABF1 wurden auch hier Bezugswerte für ABF2 und CPK23L geschaffen, indem sie getrennt voneinander transfiziert und im Balkendiagramm neben der Kontrolle abgebildet wurden. Im Gegensatz zu ABF1 war die negative Regulation durch Koexpression von CPK23L für den Transkriptionsfaktor ABF2, dargestellt in den darauf folgenden Balken, weniger stark ausgeprägt. Im Fall der ABF2 Serin⁹⁴ D Variante konnte sogar kaum eine negative Regulation durch CPK23L festgestellt werden. Auch die Koexpression von CPK23L mit der ABF2 Threonin³¹ A- und D-Substitutionen führte zu höheren Induktionswerten als die Koexpression von CPK23L mit den Wildtyp ABF2. Beachtenswert war dabei, dass wie in Abb. 3.20 B) die Induktionswerte ohne ABA der ABF2 Threonin³¹ Variante überdurchschnittlich hoch ausfielen. Die ebenfalls in Abb. 3.20 B) herausragende ABF2 Serin⁴⁵ A Variante zeigte, auch unabhängig der CPK23L Koexpression, nur eine marginale Induktion der ABA-Antwort. Die Koexpression von ABF3 und CPK23L in Abb. 3.21 C) führte, wie für ABF1, zu einer starken Reduktion der Induktionswerte, zeigte jedoch keine bedeutenden Unterschiede unter den ABF3 *phosphosite* Mutanten.

Um die Perspektive auf die ABF-Proteinkinase Interaktion zu erweitern, wurde nachfolgend CPK23C im Zusammenspiel mit den ABF *phosphosite* Mutanten untersucht (Abb. 3.22) und mit den Ergebnissen von CPK23L verglichen. In Abbildung 3.22 A) wurde die Proteinkinase CPK23C sowie ABF1 als Bezugswert getrennt transfiziert und im Balkendiagramm neben der Kontrolle dargestellt. Unabhängig von der Koexpression der CPK23C Proteinkinase wurde erneut nur eine marginale Induktion der ABA-Antwort für die ABF1 Threonin³ D Variante detektiert. Im Gegensatz zu CPK23L

zeigten die weiteren Koexpressionswerte von CPK23C mit den ABF1 P-Varianten ein höchst diverses Bild. Während einerseits einige Varianten wie ABF1 Serin²⁸ und Serin⁵⁰ dem Wildtyp ähnliche Induktionszahlen erreichten, fielen die Varianten Threonin³³ D und Threonin¹³⁵ D mit vergleichbar hohen Induktionswerten wie der ABF1 Bezugswert auf, was darauf schließen lässt, dass die koexprimierte CPK23C Proteinkinase keinen Einfluss auf diese ABF1 P-Varianten nehmen konnte. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die dauerhafte Phosphorylierung an Threonin³³ und Threonin¹³⁵ zu einem aktiven ABF1 Transkriptionsfaktor führen könnte. Da jedoch das Wildtyp ABF1 in Koexpression mit der CPK23C Proteinkinase eine negative ABA-Antwort im Vergleich zum ABF1 Bezugswert aufwies, muss eine endogene Komponente, vermutlich eine Phosphatase, diese Threonine dephosphoryliert haben, wodurch es zu einer Reduktion der ABA-Antwort kam. Einen weiteren Hinweis auf einen potentiellen Effekt der endogenen Proteinphosphatasen auf die CPK23C Koexpression lieferten die erhöhten ABF1 Induktionswerte ohne ABA, die nicht nur für ABF1 sondern auch in der Koexpression von CPK23C mit den ABF2 P-Varianten detektiert wurden (Abb. 3.22 B). Besonders ausgeprägt war dies für die ABF2 Variante Threonin³¹ D zu beobachten, die nicht nur den höchsten Wert mit ABA erreichte sondern deren Induktion ohne ABA alle anderen Werte überstieg. Generell bewirkte die Koexpression der ABF2 P-Varianten mit CPK23C eine Aktivierung der ABA-Signaltransduktion. Lediglich die schon vorher auffälligen ABF2 Varianten Serin⁴⁵ A sowie Serin⁹⁴ A induzierten eine negative Regulation der ABA-Antwort. Eine gemeinsame Expression von CPK23C mit den ABF3 P-Varianten führte ebenfalls, wie für ABF1 und ABF2, zu einer Induktion der ABA-Antwort, obwohl kein exogenes ABA zugesetzt wurde (Abb. 3.22 C). Im Vergleich des ABF3 Bezugswerts mit den koexprimierten ABF3 P-Varianten wurde eine generelle Aktivierung der ABA-Signaltransduktion deutlich. Allein die Alanin-Substitutionen der ABF3 *phosphosite* Mutante Serin¹²⁶/Threonin¹²⁸A, Threonin¹⁶⁹ A und Threonin^{277/278}A führten zu einer leichten Inhibierung der ABA-Antwort, was im Gegenzug bedeuten kann, dass durch die CPK23C Phosphorylierung dieser Aminosäuren eine Aktivierung des ABF3 Transkriptionsfaktors bewirkt wird.

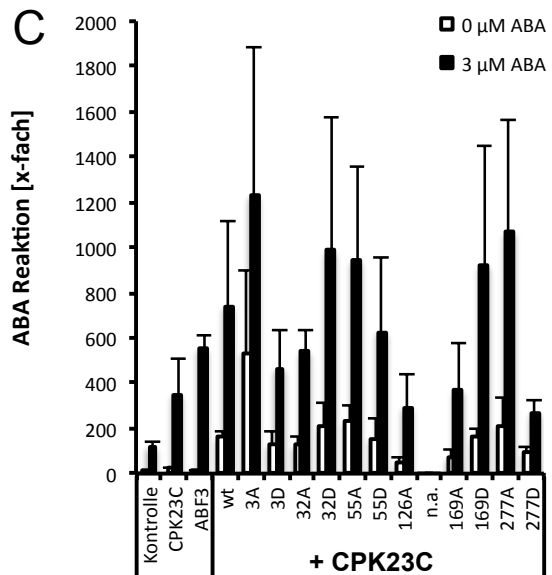
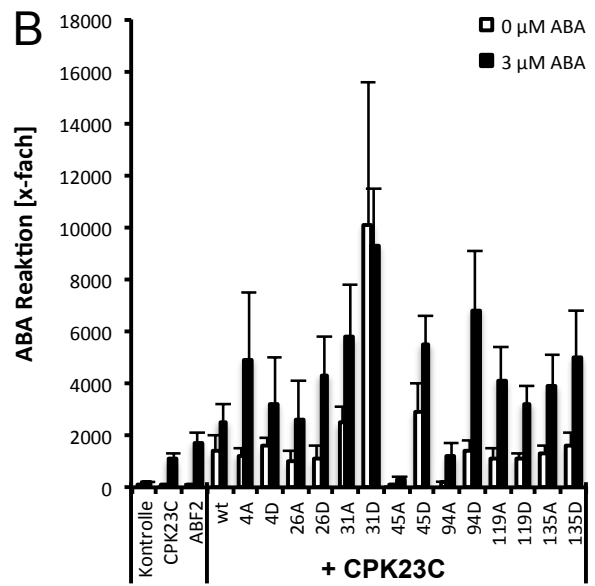
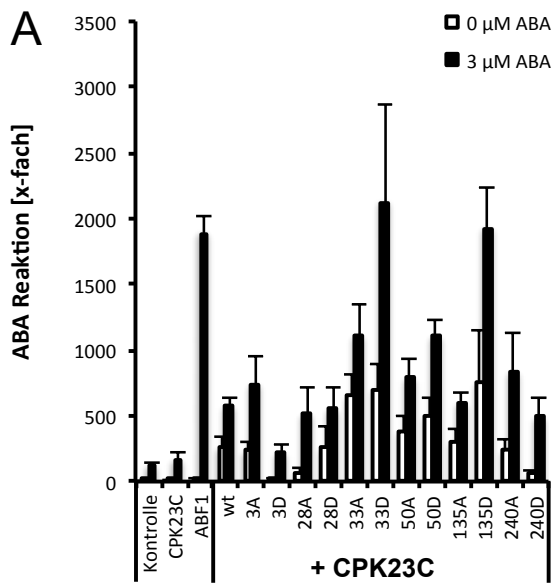


Abb. 3.22 Transiente Koexpression der ABF *phosphosite* Mutationen mit CPK23C

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten mit A) ABF1 *phosphosite* Mutationen B) ABF2 *phosphosite* Mutationen und C) ABF3 *phosphosite* Mutationen in Koexpression mit CPK23C. Alle Ansätze wurden mit 3 μ g ABF Effektor DNA, 3 μ g CPK23C DNA sowie 3 μ g GUS- und 9 μ g LUC-DNA transfiziert. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 μ M ABA bzw. Puffer induziert. Nach 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 9.

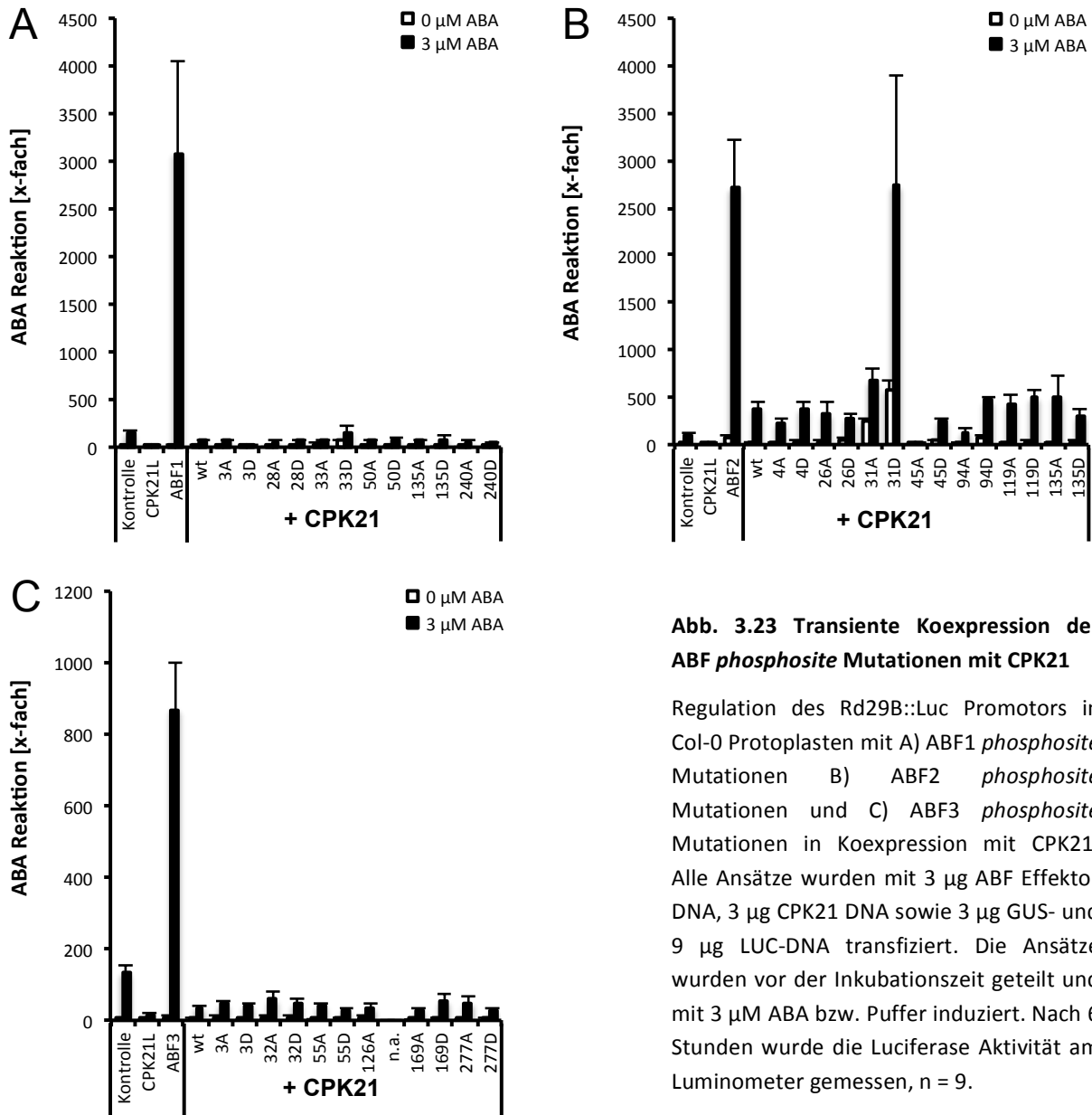


Abb. 3.23 Transiente Koexpression der ABF phosphosite Mutationen mit CPK21

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten mit A) ABF1 phosphosite Mutationen B) ABF2 phosphosite Mutationen und C) ABF3 phosphosite Mutationen in Koexpression mit CPK21. Alle Ansätze wurden mit 3 μg ABF Effektor DNA, 3 μg CPK21 DNA sowie 3 μg GUS- und 9 μg LUC-DNA transfiziert. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 μM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 9.

Die zum CPK23 Protein sehr homologe Proteinkinase CPK21 wurde im Anschluss ebenfalls *in vivo* im Protoplastenversuch durch Koexpression mit den jeweiligen ABF phosphosite Mutanten getestet und die Ergebnisse in Abbildung 3.23 dargestellt. Auf den ersten Blick haben die Balkendiagramme eine gravierende Ähnlichkeit mit den CPK23L Ergebnissen in Abbildung 3.21. Die Kontroll-Transfektionen der CPK21 Proteinkinase und des ABF1 Transkriptionsfaktors in Abb. 3.23 A) stellten die Bezugswerte der Induktion dar. Dabei unterdrückte die Expression der CPK21 Proteinkinase die Induktion des Reporters, wohingegen die Expression des ABF1 Transkriptionsfaktors eine rund 3000-fache ABA-abhängige Aktivierung bewirkte. Wurden beide Faktoren gemeinsam exprimiert, führte dies zu einer

deutlichen negativen Regulation der ABF1 induzierten ABA-Antwort um 98%, welche alle ABF1 P-Varianten gleichermaßen betraf. Allein die ABF1 Threonin³³ D Variante erreichte Induktionswerte von 160-fach und damit das Doppelte des Wildtyps. Eine ähnliche Regulation wie für ABF1 wurde durch die Koexpression von CPK21 mit dem ABF2 Transkriptionsfaktor erkennbar (Abb. 3.23 B). Jedoch zeigte sich hier die negative Regulation nicht so ausgeprägt, indem nur rund 85% der ABF2 induzierten ABA-Antwort inhibiert wurde. Die schon in vorherigen Experimenten ermittelte Mutante ABF2 Serin⁴⁵ A führte auch in diesem Versuch zu keiner Induktion der ABA-Antwort. Im Gegensatz dazu bewirkte die ABF2 Threonin³¹ D *phosphosite* Mutante eine deutliche Aufhebung der negativen Regulation durch CPK21. Durch die Mimikry einer dauerhaften Phosphorylierung an dieser Aminosäure konnte sogar der Bezugswert des aktiven ABF2 Proteins erreicht werden. Wie bereits oben deutlich wurde, musste eine endogene Komponente vorliegen, die das ABF2 Wildtyp Protein an dieser Stelle dephosphoryliert, um den gemessene ABF2 Wildtyp Wert der Koexpression zu erklären. Die in Abb. 3.23 C) getesteten ABF3 P-Varianten zeigten, wie ABF1 und ABF2, eine durch CPK21 ausgelöste negative Regulation von rund 96%, wobei keine herausragenden Unterschiede zwischen den ABF3 P-Varianten detektiert werden konnten.

Zur Abrundung des Gesamtbilds wurde die als positiver Regulator des ABA-Signalwegs bekannte OST1 Proteinkinase ebenfalls im Protoplastensystem unter Koexpression der ABF *phosphosite* Mutanten getestet. Um Wechselwirkungen mit dem endogenen Proteinlevel von OST1 zu vermeiden, wurden für diesen Versuch SnRK2D/E *knockout* Protoplasten vorbereitet und transfiziert. Wie bereits in vorherigen Publikationen (Furihata *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2009; Sirichandra *et al.*, 2010; Czap, 2015) gezeigt wurde, fungiert OST1 als positiver Regulator der ABF Transkriptionsfaktoren. In Abbildung 3.24 A) wurde dies für den Transkriptionsfaktor ABF1 bestätigt, da die Koexpression beider Proteine eine deutliche Steigerung der Induktion um das 5,5-fache im Vergleich zu den gemessenen Bezugswerten bewirkte. Bei der Betrachtung der koexprimierten ABF1 P-Varianten verhielten sich ABF1 Threonin³ D sowie Threonin³³ außerhalb der Norm. Für ABF1 Threonin³ D konnte zwar eine ABA-abhängige Induktion detektiert werden, diese hatte jedoch den gleichen Wert wie der für ABF1 gemessene Bezugswert. Eine Steigerung der Induktion durch die OST1 Proteinkinase konnte aufgrund der Mimikry einer dauerhaften Phosphorylierung nicht erreicht werden. Im Umkehrschluss muss ABF1 Threonin³ dephosphoryliert vorliegen, um eine OST1 induzierte Aktivierung zu erfahren. Als weitere auffällige ABF1 P-Variante fiel ABF1 Threonin³³ auf, da sowohl die A- als auch die D-Substitution deutlich erhöhte Induktionswerte ohne ABA aufwies. Das bedeutet, dass die Mutation an dieser Aminosäure allein eine ABA-unabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors bewirkt bzw. die Inhibierung durch eine endogene Komponente nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Ein sehr ähnlicher Effekt ließ sich ebenso in ABF2 Threonin³¹ erkennen (Abb 3.24 B). Wie auch für ABF1 Threonin³³ wurden für ABF2 Threonin³¹ deutlich erhöhte

Induktionswerte bereits in Abwesenheit von ABA detektiert. Generell bewirkte die Koexpression von OST1 mit ABF2 sehr hohe ABA-abhängige Induktionswerte um das 22-fache. Allein die ABF2 *phosphosite* Mutanten Serin⁴⁵ A und Serin⁹⁴ A und auch in geringerem Maße ABF2 Serin²⁶ wurden nicht bzw. nur leicht induziert. In Abbildung 3.24 C) ist die Koexpression von OST1 mit den P-Varianten des ABF3 Transkriptionsfaktors dargestellt. Wie ABF1 und ABF2 wurde auch ABF3 positiv reguliert, jedoch in viel geringerem Maße. Bei Betrachtung der ABF3 P-Varianten fiel nur die bereits bekannte P-Variante Threonin¹⁶⁹ D aus der Norm, welche ein zweifache Induktion im Vergleich zum Wildtyp hervorrief (Sirichandra *et al.*, 2010).

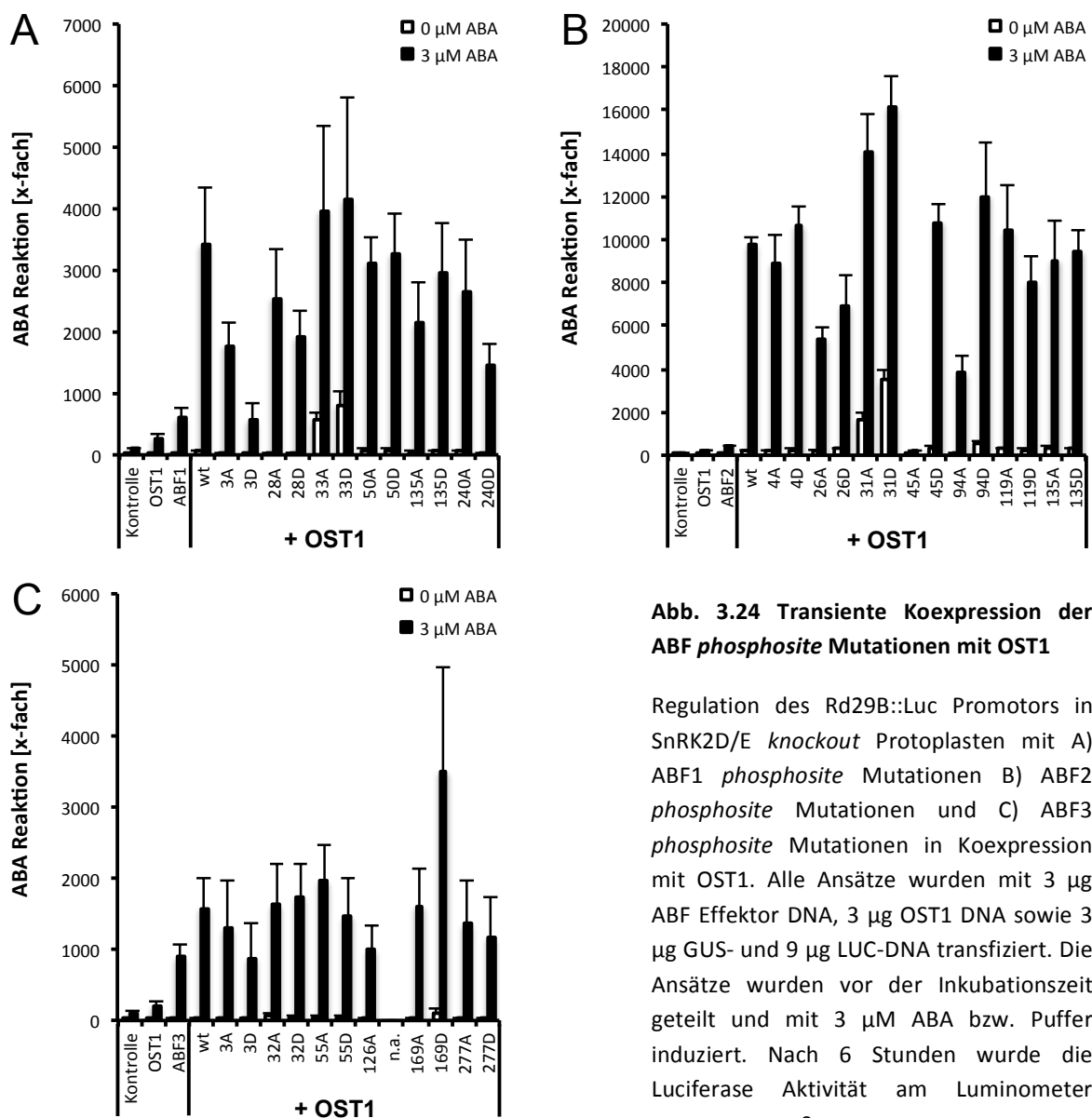


Abb. 3.24 Transiente Koexpression der ABF phosphosite Mutationen mit OST1

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in SnRK2D/E *knockout* Protoplasten mit A) ABF1 *phosphosite* Mutationen B) ABF2 *phosphosite* Mutationen und C) ABF3 *phosphosite* Mutationen in Koexpression mit OST1. Alle Ansätze wurden mit 3 μg ABF Effektor DNA, 3 μg OST1 DNA sowie 3 μg GUS- und 9 μg LUC-DNA transfiziert. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 μM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 9.

Zusammenfassend führten die Mutationen an ABF1 Threonin³³ D sowie ABF2 Threonin³¹ D unter Koexpression aller getesteten Proteinkinasen zu einer positiven Regulation des ABA-Signalwegs. Im Gegensatz dazu wirkten die Mutationen ABF1 Threonin³ D und ABF2 Serin⁴⁵ A sowie in geringerem Maße auch ABF2 Serin⁹⁴ A negativ auf diese Signaltransduktion ein. Zur Feinjustierung dieser Ergebnisse wurden Protoplasten-Titrationskurven der reprimierenden P-Varianten ABF1 Threonin³ D sowie ABF2 Serin⁴⁵ A durchgeführt, um dadurch den Effekt in Abhängigkeit der eingesetzten DNA Menge quantitativ zu analysieren (Abb. 3.25).

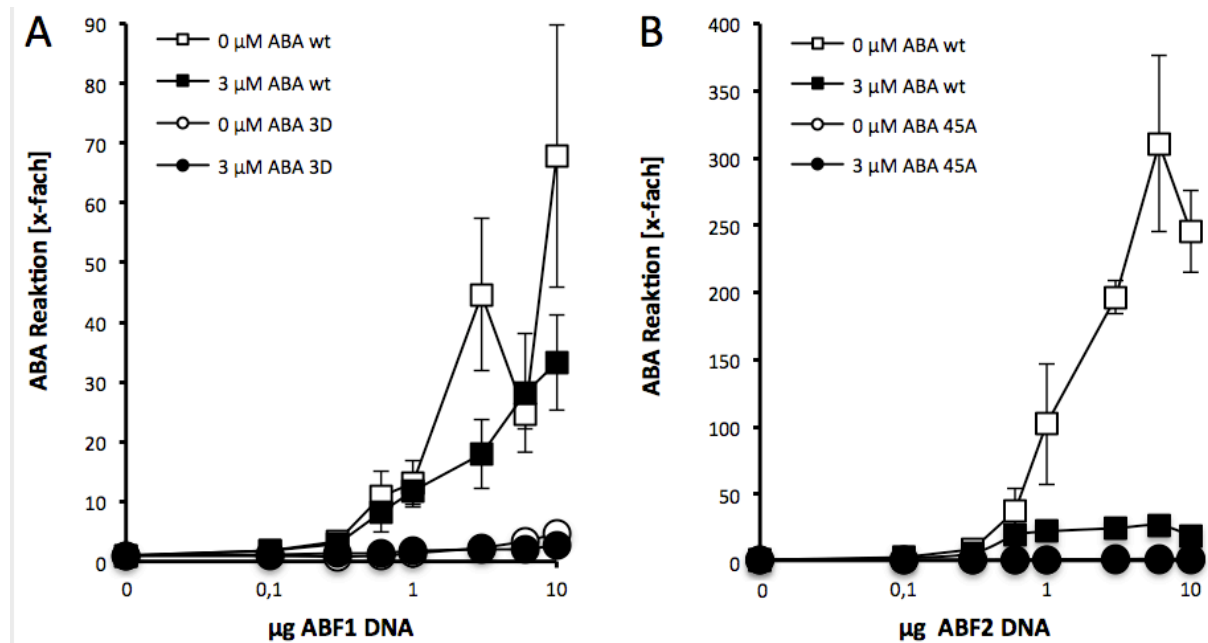


Abb. 3.25 Transiente Expression des ABF1, ABF2 Wildtyps sowie je einer reprimierenden P-Mutante

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in A) Col-0 Protoplasten mit 3 µg GUS DNA, 9 µg LUC DNA, 3 µg CPK21 DNA und steigender ABF1 wt bzw. ABF1 Threonin³ D Effektor DNA und in B) SnRK2D/E *knockout* Protoplasten mit 3 µg GUS DNA, 9 µg LUC DNA, 3 µg OST1 DNA und ansteigender ABF2 wt bzw. ABF2 Serin⁴⁵ A Effektor DNA. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Die Titrationskurven der Wildtyp ABF Transkriptionsfaktoren werden durch Quadrate markiert, während die Titrationskurven der P-Varianten durch einen Kreis symbolisiert werden. Wurde 3 µM ABA in der Messreihe verwendet, ist das jeweilige Symbol schwarz ausgefüllt, andernfalls blieb das Symbol weiß. Nach 6 Stunden Inkubation bei 22°C und Dauerlicht wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer gemessen, n = 6. Alle Werte wurden normiert und der Ausgangswert ohne ABA, als auch mit ABA auf 1 gesetzt.

In Abbildung 3.25 sind die Titrationskurven einer Proteinkinase in Abhängigkeit der steigenden ABF DNA Konzentration dargestellt. In Abbildung 3.25 A) sind die Titrationskurven der DNA-abhängigen Messung vom ABF1 Wildtyp und der ABF1 Threonin³ D *phosphosite* Mutante in Koexpression mit der CPK21 Proteinkinase aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf wird ersichtlich, dass die aus der Koexpression mit CPK21 entstandene Repression der ABA-Antwort durch zunehmende ABF1 Wildtyp Expression ABA-unabhängig aufgehoben werden konnte. Vergleicht man diese Titrationskurve mit der ABF1 Threonin³ D Variante, wird deutlich, dass diese erst bei sehr hohen Effektor DNA Konzentrationen eine marginale Induktion der ABA-Antwort zeigte. Ein ähnliches Verhalten konnte durch die Analyse der Koexpression von OST1 mit ABF2 in Abbildung 3.25 B) beobachtet werden. Da die Daten der Titrationskurven normiert und auf den Bezugswert 1 gesetzt wurden, zeigte im Fall der Koexpression von OST1 und ABF2 Wildtyp die Titrationskurve ohne ABA eine bedeutendere Effektor DNA-abhängige Induktion, während für die Titrationskurve mit ABA ein geringerer Anstieg zu detektieren war, deren Absolutwerte insgesamt jedoch um das 12-fache höher lagen. Die Koexpression des positiven Regulators OST1 mit der ABF2 Serin⁴⁵ A *phosphosite* Mutante zeigte weder mit noch ohne ABA eine Effektor DNA-abhängige Änderung.

Zusammenfassend konnte weder der Effekt der reprimierenden CPK21 Proteinkinase noch des positiven Regulators OST1 durch die *phosphosite* Mutanten ABF1 Threonin³ D bzw. ABF2 Serin⁴⁵ A Effektor DNA abhängig beeinflusst werden. Somit scheint es, dass der Phosphorylierungsstatus dieser ABF P-Varianten eine wichtige Rolle für die ABA-Signalweiterleitung in Protoplasten einnimmt. Da eine Phosphorylierung eine posttranslationale Modifikation ist, die angefügt, aber auch wieder entfernt werden kann, ist es von großer Relevanz auch die dafür vorgesehenen Proteinphosphatasen des ABA-Signalwegs genauer zu untersuchen. Eine Interaktion der Proteinkinasen mit den PP2C Proteinphosphatasen TypC wurde für CPK23L vk bereits nachgewiesen (Fuchs, 2013). Im nachfolgenden Kapitel soll daher die Interaktion zwischen den Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 sowie OST1 und den Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 der ABA-Signaltransduktion genauer untersucht werden.

3.6 PP2C Proteinphosphatasen als Substrat der Proteinkinasen im ABA-Signalweg

Proteinphosphatasen sind neben den RCAR Proteinen die zweite Komponente des ABA Rezeptorkomplexes und damit essentiell für die ABA-Signalweiterleitung. In Arabidopsis gibt es allein 80 Proteinphosphatasen in 12 Untergruppen A bis L, von denen aber nur die 9 Mitglieder der *clade A* Untergruppe in die ABA-Signaltransduktion involviert sind (Xue *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2012). Da Proteinphosphatasen sowohl zytosolisch als auch im Kern lokalisiert sind, können sie mit Proteinkinasen, Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren interagieren und diese regulieren (Reyes *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2012; Ohta *et al.*, 2003). Die Interaktion einiger *clade A* Proteinphosphatasen mit den Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 des ABA Signalwegs soll im nachfolgenden Kapiteln genauer beleuchtet werden.

3.6.1 Analyse der PP2C Phosphatasen als Substrat der Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1

Wie in vorherigen Kapiteln begann die Suche nach möglichen Interaktionspartnern der Proteinkinasen mit einem radioaktiven Aktivitätstest, wobei die PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 als Substrate dienten. Da eine Proteinphosphatase jedoch die Möglichkeit besitzt sowohl Proteine im Signalweg als auch sich selbst zu dephosphorylieren, ist ein Nachweis einer Phosphorylierung an diesen Proteinen nur anhand eines Versuchsaufbaues möglich, bei dem die Phosphatase sowohl aktiv als auch inaktiv vorliegt. Aus diesem Grund wurde im nachfolgenden Experiment versucht, die ABA-Signalkaskade *in vitro* nachzustellen. Dazu wurden in einem Ansatz RCAR11, Proteinkinasen, Casein und die unterschiedlichen PP2Cs miteinander kombiniert und sowohl mit als auch ohne 30 μ M ABA inkubiert. In Anwesenheit des ABA-Moleküls bildet sich der RCAR-PP2C Komplex, wodurch die Proteinphosphatase inaktiviert wird und mögliche Substrate, die durch die Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion phosphoryliert wurden, nun in einem phosphorylierten Zustand vorliegen können. In demselben Ansatz ohne ABA kann die jeweils verwendete Phosphatase aktiv bleiben und sich selbst bzw. Substrate, die vorher phosphoryliert wurden, wieder dephosphorylieren.

In Abbildung 3.26 sind die Autoradiogramme der verschiedenen Ansätze der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 in Kombination mit den Proteinphosphatasen dargestellt. Auf der linken Seite des Autoradiogramms ist der Zustand mit 30 μ M ABA zu sehen, während die rechte Hälfte identische Ansätze ohne ABA zeigt. In den jeweils vier aufgetragenen Ansätzen wurden die unterschiedlichen Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 auf Phosphorylierung durch die Proteinkinasen untersucht. Die oberste in allen Spuren auftretende Bande ist die Autophosphorylierung der jeweiligen Proteinkinase. Darunter liegen die Banden der phosphorylierten PP2Cs. Am unteren Ende der Gele können Phosphorylierungsbanden von Casein und zugesetztem RCAR Protein auftreten.

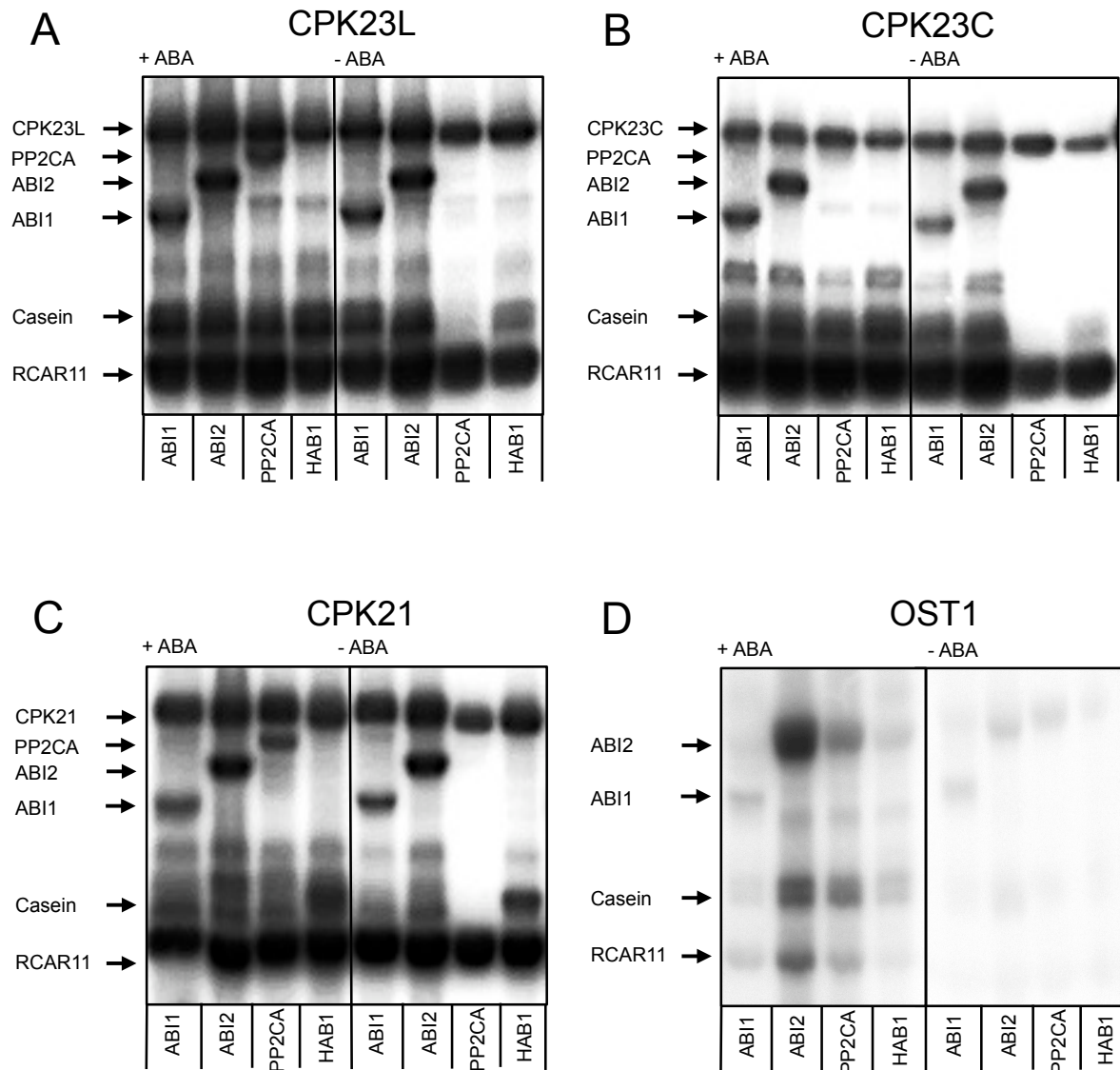


Abb. 3.26 Phosphorylierung der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1

Abbildung der Autoradiogramme der Phosphorylierung der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1. In radioaktiven Aktivitätsmessungen wurden in einem 20 µl Ansatz 1 µg Proteinkinase mit 1 µg des jeweiligen PP2C Proteins, 1 µg RCAR11 und 0,5 µg Casein im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂) versetzt. Durch Inkubation mit 30 µM ABA bzw. Puffer wurde die Aktivität der Phosphatase reguliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 µCi γ-³²P-ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen und dieses nach dem Gellauf getrocknet. Die Analyse aller Ansätze erfolgte nach einem Tag anhand des Phosphor-Imager BAS 1800. Abgebildet sind die Autoradiogramme der durchgeführten Versuche. Die linke Seite der Autoradiogramme stellt die Situation mit 30 µM ABA dar, die rechte Hälfte ohne ABA. Phosphorylierung erfolgte durch die Proteinkinasen A) CPK23L, B) CPK23C, C) CPK21 und D) OST1.

Abbildung 3.26 A) stellt die Ergebnisse eines solchen Versuches dar, wobei die Phosphorylierung durch die CPK23L Proteinkinase erfolgte. In Anwesenheit von ABA lagen alle zugesetzten Komponenten phosphoryliert vor, was bedeutet, dass CPK23L sowohl sich selbst, RCAR11, Casein als auch die Proteinphosphatasen ABI1, ABI2 und PP2CA phosphorylieren konnte. Ob CPK23L auch die Phosphatase HAB1 phosphorylierte, konnte aufgrund des ähnlichen Molekulargewichte dieser Proteine (HAB1 56,6 kDa; CPK23L 59,8 kDa) und der damit einhergehenden Überlagerung der Phosphorylierungsbanden im Gel nicht genau bestimmt werden. In der rechten Hälfte des Autoradiogramms sind die identischen Ansätze ohne ABA gezeigt. Obwohl die Proteinphosphatasen unter diesen Bedingungen aktiv sein sollten, lagen fast alle Komponenten dennoch phosphoryliert vor. Allein die PP2CA Phosphatase konnte sich selbst aber auch das Casein Substrat dephosphorylieren. Die CPK23L Proteinkinase und das RCAR11 Protein wurden unter den getesteten Bedingungen nicht dephosphoryliert. In abgeschwächter Form war dies auch für die HAB1 Phosphatase zu erkennen. Für ABI1 und ABI2 konnte kein Unterschied zwischen den Situationen mit und ohne ABA beobachtet werden. Ein vergleichbares Bild ergab sich aus der Phosphorylierung der Proteinphosphatasen durch die CPK23C Proteinkinase in Abb. 3.26 B). Die Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 hatten sowohl mit als auch ohne ABA keinen Einfluss auf die CPK23C abhängige Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu wurde PP2CA in beiden Situationen nicht phosphoryliert, zeigte jedoch ohne ABA Aktivität, indem das zugesetzte Casein Substrat dephosphoryliert wurde. Der gleiche Effekt konnte auch für die Interaktion von CPK23C mit HAB1 beobachtet werden. Vergleicht man das Autoradiogramm der CPK21 Proteinkinase (Abb. 3.26 C) mit den CPK23 Autoradiogrammen wird für CPK23L und CPK21 ein übereinstimmendes Phosphorylierungsmuster beobachtet, bei dem PP2CA, in Anwesenheit von ABA, phosphoryliert vorlag. Ein gravierender Kontrast zu den Bandenmustern der CPK Proteinkinasen offenbart sich in der Betrachtung des Autoradiogramms in Abb. 3.26 D). Statt der CPK Proteinkinasen wurde für diesen Versuch die calciumunabhängige OST1 Proteinkinase verwendet. Die bisher beobachtete Autophosphorylierung der Proteinkinase konnte für OST1 nicht detektiert werden, was eine Dephosphorylierung der Phosphorylierungsstellen durch die verwendeten Proteinphosphatasen vermuten lässt. Bemerkenswerterweise geschah dies ABA-unabhängig, das bedeutet, auch in einem Zustand in dem die Proteinphosphatasen aufgrund von ABA und RCAR11 inaktiv vorliegen sollten (Santiago *et al.*, 2009). Generell konnte in Anwesenheit von ABA nur in Kombination von OST1 mit ABI2 Phosphorylierungsbanden sowohl der Phosphatase als auch von Casein und RCAR11 detektiert werden. Alle anderen Proteinphosphatasen ABI1, PP2CA und HAB1 dephosphorylierten ABA unabhängig sich selbst, OST1, Casein und RCAR11.

ERGEBNISSE

Dieser oben gezeigte Versuchsaufbau ermöglichte es, einen erheblichen Unterschied in der Regulation des ABA-Signalwegs durch die Phosphorylierung der CPKs im Vergleich zu der OST1 Proteinkinase zu detektieren. Aber auch unter den CPKs selbst konnte eine Divergenz in der Phosphorylierung der PP2CA Phosphatase beobachtet werden. Hinzu kommt, dass auch die getesteten Proteinphosphatasen individuell auf die unterschiedliche Kombination der Proteinkinasen reagierten. Dabei wurde der Einfluss der unterschiedlichen RCAR Komponenten nicht mit einbezogen, da bisher nur RCAR11 untersucht wurde. Genau dieser Effekt soll in den nachfolgenden Experimenten präziser studiert werden. Dazu wurde der Einflussparameter der Proteinkinase konstant gehalten, indem bei allen Ansätzen CPK21 verwendet wurde und die Komponente der RCAR Proteine variiert.

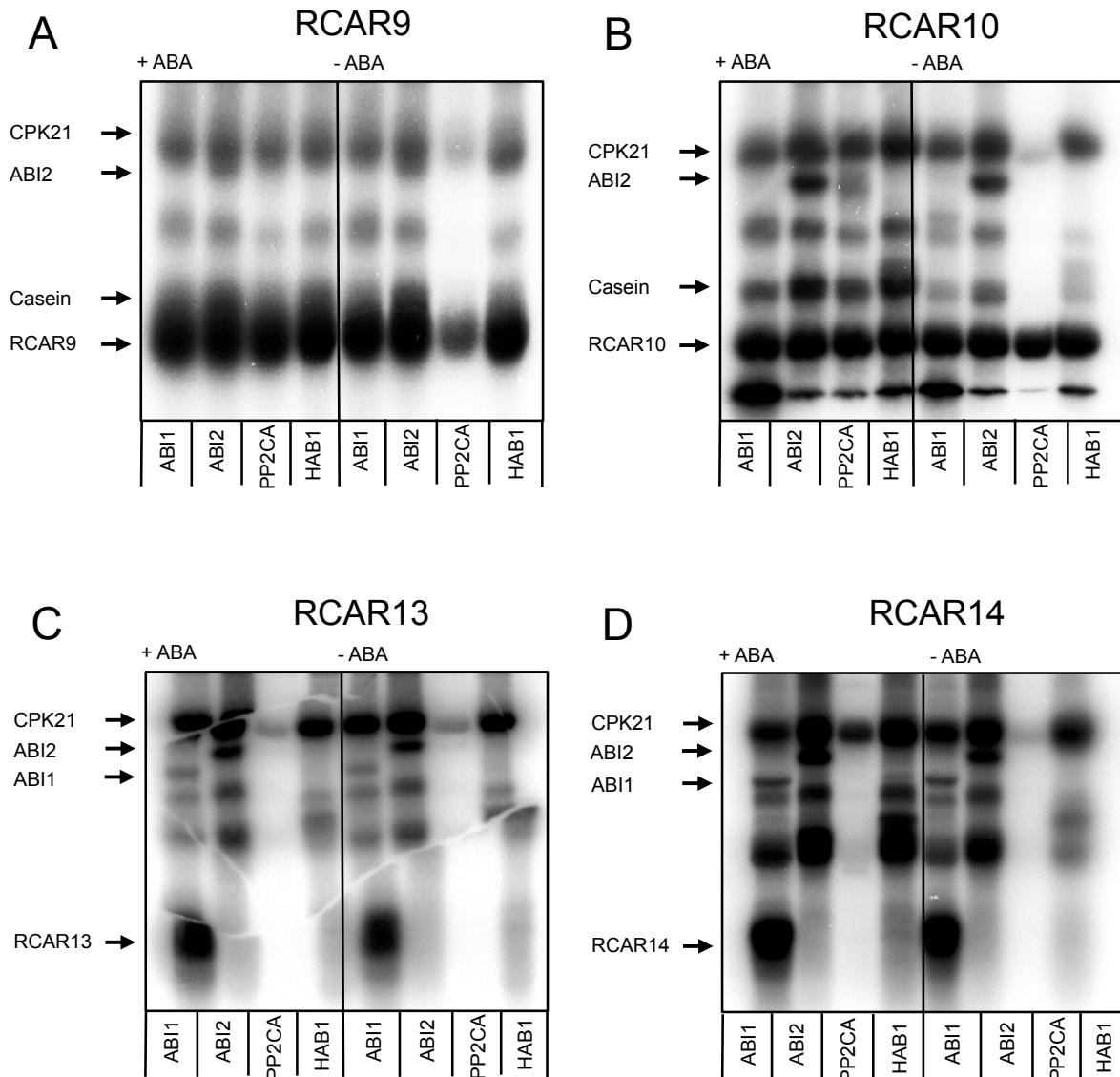


Abb. 3.27 Phosphorylierung der PP2C Phosphatasen durch CPK21 in Kombination mit verschiedenen RCARs

Abbildung der Autoradiogramme der Phosphorylierung der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 durch die Proteinkinase CPK21. In radioaktiven Aktivitätsmessungen wurden in einem 20 µl Ansatz 1 µg CPK21 Proteinkinase mit 1 µg des jeweiligen PP2C Proteins, 1 µg des jeweiligen RCAR Proteins und 0,5 µg Casein im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂) versetzt. Durch Inkubation mit 30 µM ABA bzw. Puffer wurde die Aktivität der Phosphatase reguliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 µCi γ-³²P-ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen und dieses nach dem Gellauf getrocknet. Die Analyse aller Ansätze erfolgte nach einem Tag anhand des Phosphor-Imager BAS 1800. Der RCAR-PP2C Komplex wurde mit A) RCAR9, B) RCAR10, C) RCAR13 und D) RCAR14 untersucht.

Die Versuchsdurchführung wurde wie im vorherigen Experiment beibehalten, dabei variierten die RCAR Proteine zwischen RCAR9, RCAR10, RCAR13 und RCAR14, während die Proteinkinase mit CPK21 konstant blieb. Eine Interaktion dieser Phosphatase-RCAR Kombinationen konnte durch *yeast2hybrid* bereits bestätigt werden (Fuchs, 2013, Geiger *et al.*, 2009). Zudem wurde eine Phosphorylierung der RCAR Proteine RCAR9, RCAR10, RCAR13 und RCAR14 durch die Proteinkinase CPK21 bereits in Abbildung 3.12 nachgewiesen. In Abbildung 3.27 A) ist das Autoradiogramm der nachgestellten Signalkaskade von RCAR9 in Kombination mit CPK21, Casein und wechselnden Proteinphosphatasen dargestellt. Neben der Autophosphorylierung der Proteinkinase war auch Casein sowie RCAR9 deutlich als Phosphorylierungssubstrat der Proteinkinase zu erkennen. Jedoch konnte keine Phosphorylierung der ebenfalls im Ansatz vorhandenen Proteinphosphatasen detektiert werden. Im Vergleich der Situation mit und ohne ABA scheint es, dass wiederum nur PP2CA ohne ABA aktiv vorlag und dadurch das Casein und RCAR9 dephosphorylierte und sogar die Autophosphorylierung der CPK21 Proteinkinasen reduzieren konnte. Betrachtet man das Autoradiogramm des Mitglieds derselben Untergruppen RCAR10 (Abb. 3.27 B), zeigte sich ein ähnliches Bild. In der Kombination mit RCAR10 war CPK21 in der Lage sich selbst, Casein, RCAR10 als auch die anwesenden Proteinphosphatasen zu phosphorylieren. Jedoch bringt diesmal der Vergleich des Ansatzes mit und ohne ABA gravierendere Unterschiede ans Licht. Bis auf ABI2 waren alle untersuchten Proteinphosphatasen ohne ABA aktiv und konnten sich selbst sowie auch Casein dephosphorylieren. Besonders stark war dies für PP2CA der Fall, das als einzige der getesteten Proteinphosphatasen auch CPK21 dephosphorylieren konnte. Obwohl RCAR9 und RCAR10 derselben Untergruppe II der RCAR Familie angehören, konnten sie die Proteinphosphatasen unterschiedlich beeinflussen und divergente Regulationen bewirken, ohne dass dadurch ihre eigene Phosphorylierung verändert wurde. Dies war bei der Analyse der Signalkaskade mit RCAR13 und RCAR14, Mitglieder der Untergruppe III der RCAR Familie, nicht der Fall (Abb. 3.27 C und D). Durch die Auswertung des Autoradiogramms der Signalkaskade mit RCAR13 in Kombination mit CPK21, Casein und den Proteinphosphatasen wurde deutlich, dass das RCAR13 Protein nur im Zusammenspiel mit ABI1 nicht

dephosphoryliert wurde. Ebenfalls sehr auffällig war die Tatsache, dass keine Unterschiede zwischen dem Zustand mit und ohne ABA detektiert wurden, was bedeuten könnte, dass RCAR13 unabhängig von ABA die Proteinphosphatasen aktiviert oder inhibiert. Die Interaktion zwischen ABI1 und RCAR13 führte zu einer inaktiven Phosphatase, da sowohl CPK21 als auch das RCAR selbst in einem phosphorylierten Zustand detektiert werden konnten. Ob Casein ebenfalls noch phosphoryliert vorlag, konnte aufgrund des identischen Molekulargewichts von RCAR13 und Casein nicht genau bestimmt werden. Die Interaktion von RCAR13 mit ABI2 führte einerseits zu einem unphosphorylierten RCAR13, andererseits konnte sowohl CPK21 als auch ABI2 phosphoryliert detektiert werden. Die stärkste Aktivierung durch RCAR13 wurde ABA-unabhängig bei PP2CA beobachtet, welche alle vorhandenen Komponenten dephosphorylierte, was *in vivo* zu einer Inhibierung der ABA-Signaltransduktion führt. Zuletzt wurde die Interaktion mit RCAR13 und HAB1 analysiert, die ähnlich zu ABI2, eine Autophosphorylierung der Proteinkinase ermöglichte, aber keine Aussage über den Phosphorylierungszustand von HAB1 selbst zuließ. Da RCAR13 und RCAR14 homologe Proteine derselben RCAR Untergruppe III sind, war es nicht verwunderlich, dass sie einen vergleichbaren Einfluss auf die *in vitro* nachgestellte Signalkaskade nahmen (Abb. 3.27 D). Dennoch konnten auch Abweichungen zwischen RCAR14 und RCAR13 beobachtet werden. So konnte die Autophosphorylierung von CPK21 in Kombination von PP2CA und ABA noch deutlich detektiert werden, während sie ohne ABA an der Detektionsgrenze lag.

Bei dem Versuch diese Ergebnisse zusammenzufassen wird deutlich, wie komplex die Regulation der ABA-Signaltransduktion ist. Zum einen ist nicht nur das Zusammenspiel der Proteinkinasen mit den Proteinphosphatasen von großer Bedeutung, auch die Interaktion mit den jeweiligen RCAR Proteinen kann die Signaltransduktion ABA-abhängig oder -unabhängig beeinflussen. Dies wird im Beispiel der Kombination von CPK21, PP2CA und RCAR11 bzw. RCAR13 deutlich. Wird PP2CA von RCAR11 gebunden, kann eine ABA-abhängige Regulation stattfinden, wobei jedoch in beiden Fällen sowohl CPK21 als auch RCAR11 weiterhin phosphoryliert vorliegen. Bilden jedoch PP2CA und RCAR13 einen Komplex, kommt es zu einer ABA-unabhängigen Dephosphorylierung aller Komponenten und damit zu einer Inhibierung der Signalkaskade. Inwieweit die im Versuch 3.26 nachgewiesene Phosphorylierung der Proteinphosphatasen durch die Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion Einfluss auf diese Regulation oder der PP2C Interaktionen im Allgemeinen nehmen kann, ist jedoch noch offen. Um darüber eine Aussage treffen zu können, müssten die genauen Phosphorylierungsstellen identifiziert und *in vivo* untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die bereits untersuchten Proteinphosphatasen in einem inaktiven Zustand durch die Proteinkinasen phosphoryliert und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

3.6.2 Phosphorylierungsstellen der PP2C Proteine ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1

Zur Analyse der genauen Phosphorylierungsstellen der Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 mussten diese in einem inaktiven Zustand vorliegen, um eine Dephosphorylierung ihrer selbst zu verhindern. Dazu wurden die Proteinphosphatasen, wie in Abb. 3.26, mit RCAR11, ABA sowie den Proteinkinasen inkubiert, wodurch es möglich wurde die phosphorylierten Proteinphosphatasen zur massenspektrometrischen Untersuchung an die WWU Münster zu senden. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.28 in Form eines Sequenzalignments der Primärsequenzen der Proteinphosphatasen dargestellt.

Abb. 3.28 Phosphorylierungsstellen der PP2C Phosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1

Die Analyse der Phosphorylierungsstellen erfolgte anhand einer massenspektrometrischen Auswertung der durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 phosphorylierten PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 und ist in Form eines Sequenzalignments der PP2C Primärsequenzen dargestellt. Zur massenspektrometrischen Auswertung wurde 1 µg der Proteinphosphatase mit 1 µg RCAR11, 30 µM ABA sowie 1 µg der jeweiligen Proteinkinase in einem 100 µl Ansatz mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 mM MnCl₂) und 2 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 10-fachen SDS-Probenpuffers abgestoppt und das Protein auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die jeweilige PP2C Bande ausgeschnitten, getrocknet und zur Analyse nach Münster versendet. Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden anhand eines Sequenzalignments veranschaulicht. Rot markierte Aminosäuren zeigen die massenspektrometrisch gefundenen Phosphorylierungsstellen. Identische Aminosäuren sind durch ein (*) gekennzeichnet, sehr ähnliche Aminosäuren durch einen (:), sowie ähnliche Aminosäuren durch einen (.). Eine detaillierte Illustration der massenspektrometrischen Daten inklusive der Sequenzabdeckung befindet sich im Anhang.

Betrachtet man die Verteilung der detektierten Phosphorylierungsstellen der Proteinphosphatasen, wird deutlich, dass sich ein Großteil im N-terminalen Bereich der Proteine wiederfindet, der meist unterschiedliche Länge und hohe Variabilität zwischen den getesteten Proteinphosphatasen aufweist. Obwohl die Funktion der N-Termini der Proteinphosphatasen nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass dieser sowohl für die Substratspezifität als auch für die Komplexbildung von Bedeutung ist. In der Nähe der ersten Ionenbindestelle von ABI1 und ABI2 wurde eine vermehrte Anhäufung an phosphorylierten Serinen, ABI1 Serin^{154, 155, 156} und Serin¹⁵⁸ sowie ABI2 Serin^{139, 140, 141, 142}, in diesen Proteinen entdeckt, welche in PP2CA und HAB1 nicht konserviert sind (Abb. 3.28). Generell konnten für ABI1 und ABI2 eine Vielzahl an übereinstimmenden konservierten Phosphorylierungsstellen detektiert werden, wie das ABI1 Tyrosin³¹⁹ respektive ABI2 Tyrosin³⁰⁹. Dieses liegt auch in PP2CA und HAB1 konserviert vor, da diese Aminosäure in der Interaktionsfläche mit den RCAR Proteinen liegt. Wird dieses Tyrosin in ABI1 durch ein Alanin substituiert, kann dadurch die Substrataffinität beeinflusst werden (Miyazono *et al.*, 2009). Neben diesen konservierten Aminosäuren konnte aber auch ein deutlicher Unterschied zwischen ABI2 und den restlichen untersuchten Proteinphosphatasen entdeckt werden. Während ABI2 an Serin¹²⁸ phosphoryliert wurde, wiesen alle anderen Proteinphosphatasen an dieser Position ein Alanin auf. Im Allgemeinen beinhaltet dieser Bereich zwischen den Aminosäuren ABI2 Serin¹²⁸ bis Threonin¹³¹ eine höchst interessante Abfolge von Aminosäuren „DSVST“, welche zwar ähnlich zu ABI1 „DAVST“ ist, jedoch in einem starken Kontrast zu der HAB1 Abfolge „DAFAV“ und PP2CA „DAVSI“ steht. Eine genauere Analyse der gefundenen Phosphorylierungsstellen durch Klonierung von *phosphosite* Mutationen mit anschließenden *in vivo* Experimenten war aus Zeitgründen nicht möglich. Mit diesen Phosphorylierungsdaten ist jedoch der Grundstein für eine Fülle an Protoplasten-, Proteinphosphatase- und Proteinkinase-Experimenten gelegt, welche die Interaktions- und Regulationsmuster der ABA-Signaltransduktion weiter entschlüsseln könnten.

3.6.3 Untersuchung des Einflusses von PP2CA auf Proteinkinasen im Protoplastensystem

Grundlegender als die Analyse der PP2C *phosphosite* Mutationen war die generelle Untersuchung der Proteinphosphatasen im Protoplastensystem und deren Einfluss auf die einzelnen Proteinkinasen des ABA-Signalwegs. Da in vorhergehenden Experimenten besonders PP2CA die größten Unterschiede mit und ohne ABA aufwies, liegt der Fokus nachfolgender Experimente auf dieser Phosphatase. Den stärksten Einfluss hatte PP2CA *in vitro* auf die SnRK2 Proteinkinase OST1 (Abb. 3.26 D). Aus diesem Grund beginnen mit dieser Proteinkinase die *in vivo* Experimente im Protoplastensystem. Dazu wurden SnRK2D/E *knockout* Protoplasten vorbereitet und mit 3 µg GUS, 9 µg LUC sowie je 3 µg Effektor-DNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität der transfizierten Protoplasten am Luminometer ausgelesen (Abb. 3.29).

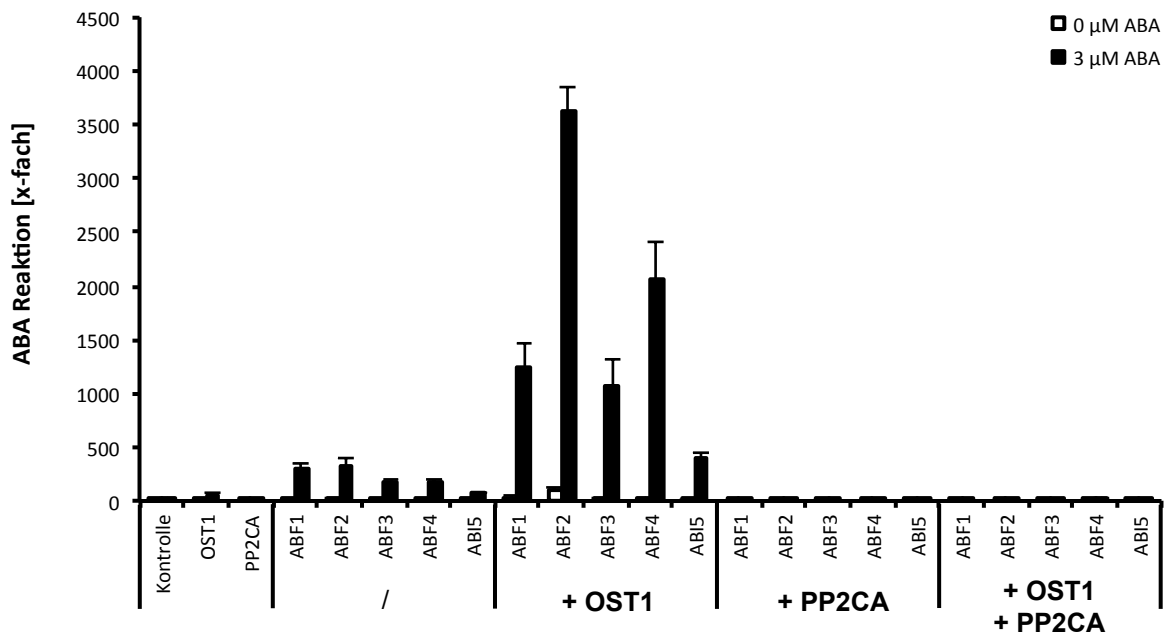


Abb. 3.29 Transiente Koexpression der PP2CA Phosphatase, ABF Transkriptionsfaktoren und OST1

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in SnRK2D/E *knockout* Protoplasten durch OST1, den ABF Transkriptionsfaktoren in Koexpression mit der PP2CA Phosphatase. Für die jeweiligen Ansätze wurden 3 µg GUS DNA, 9 µg LUC DNA, 3 µg ABF DNA, 3 µg OST1 DNA sowie 3 µg PP2CA DNA verwendet. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer ausgelesen, n = 9.

In Abbildung 3.29 wurde sowohl der Einfluss der OST1 Proteinkinase auf die Induktionswerte der ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 sowie ABI5 als auch die Auswirkungen auf diese Werte durch Zugabe von PP2CA untersucht. Die erhaltenen Daten wurden normiert und in Form eines Balkendiagramms aufgetragen, wobei schwarze Balken die Induktionswerte in Anwesenheit von ABA darstellen, während weiße Balken die Werte ohne ABA wiedergeben. Die ersten Balken des Diagramms geben die Kontrollen der einzelnen Komponenten wieder, indem die Protoplasten nur mit diesen Effektoren transfiziert wurden. Ohne OST1 erreichten die ABF Transkriptionsfaktoren Induktionswerte von rund 500-fach. Die Kombination der ABFs mit der OST1 Proteinkinase führte zu einer rund 4-fachen Induktion von ABF1, einer 6-fachen Induktion von ABF3 und ABI5 bis hin zu einer 11-fachen Induktion von ABF2 und ABF4 der vorher detektierten Werte. Diese positive ABA-Antwort wurde jedoch durch die Koexpression von PP2CA unterdrückt, unabhängig ob OST1 als positiver Regulator vorlag oder nicht.

Im Anschluss an diesen Versuch wurde das Experiment mit den calciumabhängigen Proteinkinasen CPK23L, CPK23C sowie CPK21 in Col-0 Protoplasten wiederholt (Abb. 3.30 A). Um Bezugswerte zu schaffen, wurden die einzelnen Proteinkinasen und die ABF Transkriptionsfaktoren getrennt transfiziert, gefolgt von den unterschiedlichen Kombinationen aus PP2CA und Proteinkinase. Die generierten Daten wurden normiert und als Balkendiagramm dargestellt, welches die Induktionswerte mit ABA schwarz abbildet, die Werte ohne ABA hingegen weiß. Schon allein die Betrachtung der Kontrollwerte der untersuchten CPK23L, CPK23C und CPK21 stellt das divergente Verhalten dieser CPKs zur Schau. Den höchsten Induktionswert der Proteinkinasen erreichte CPK23C mit einer 160-fachen Induktion der ABA-Antwort, welcher damit 7-fach über dem Wert von CPK23L und sogar 20-fach über den Wert von CPK21 lag. Die Bezugswerte der ABF Transkriptionsfaktoren wurden ohne zusätzlichen Regulator im Maximum bereits 1000-fach induziert. In Kombination mit den Proteinkinasen und der PP2CA Phosphatase wurde diese ABA-Antwort jedoch komplett unterdrückt, was für ABF1 eine Reduktion auf rund 0,15% des gemessenen Kontrollwerts bedeutete. Grob betrachtet scheint die Inhibierung durch PP2CA auf alle Ansätze der Proteinkinasen gleich zu wirken. Betrachtet man allerdings die Werte der inhibierten Ansätze genauer (Abb. 3.30 B), ergeben sich augenscheinliche Abweichungen. Während die Induktionswerte der ABFs mit den koexprimierten Proteinkinasen CPK23L und CPK21 durch die Anwesenheit von PP2CA auf ein Minimum reduziert wurden, konnte in der Kombination mit CPK23C eine 4-fach höhere ABA-Antwort im Vergleich zu ihren CPK Homologen detektiert werden. Dabei fallen zum wiederholten Male die bei CPK23C detektierten hohen Induktionswerte ohne ABA auf, welche kaum Abweichungen zu den Induktionswerten mit ABA aufwiesen.

ERGEBNISSE

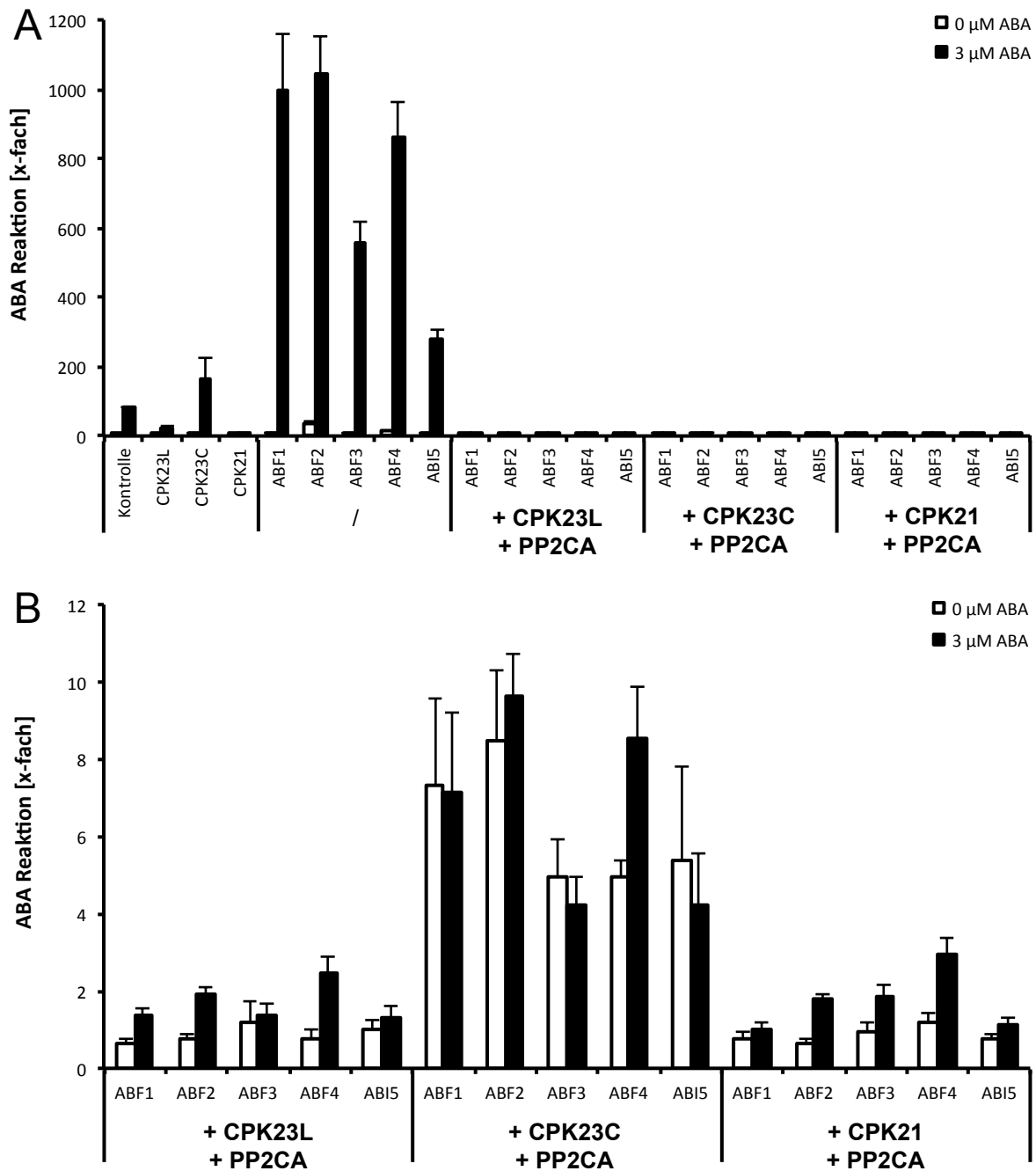


Abb. 3.30 Transiente Koexpression der PP2CA Phosphatase, ABF Transkriptionsfaktoren und den CPKs

A) Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und CPK21 in Koexpression mit den ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4, ABI5 und der Proteinphosphatase PP2CA. Für die jeweiligen Ansätze wurden 3 μg GUS DNA, 9 μg LUC DNA, 3 μg ABF DNA, 3 μg CPK DNA sowie 3 μg PP2CA DNA verwendet. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 μM ABA bzw. Puffer induziert. Nach 6 Stunden wurde die Luciferase Aktivität am Luminometer ausgelesen. B) zeigt einen Ausschnitt aus A), n = 6 .

Betrachtet man die Ergebnisse aus der ausgewählten Perspektive in Abbildung 3.30 B), liegt die Vermutung nahe, dass PP2CA eine divergente Wirkung auf die untersuchten CPKs hat. Diese Unterschiede könnten *in vivo* vermutlich durch PP2CA-abhängige Titrations deutlicher hervorgehoben werden. Eine andere Methode, diese Annahme zu validieren, ist die Untersuchung der Interaktion zwischen Proteinkinase und Phosphatase im *in vitro* Phosphatase-Aktivitätstest.

3.6.4 PP2CA Aktivität unter Einfluss der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1

Bereits in der Auswertung der *in vivo* Protoplasten Daten zeichnete sich eine differente Regulation der ABA-Antwort zwischen den homologen Proteinkinasen CPK23L, CPK23C sowie CPK21 ab, welche auf eine mögliche Einflussnahme der Proteinphosphatasen hindeutete (siehe Abbildung. 3.21; 3.22; 3.23; 3.30 B). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Phosphatase-Aktivitätstest der PP2CA Phosphatase in Kombination mit den Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion durchgeführt.

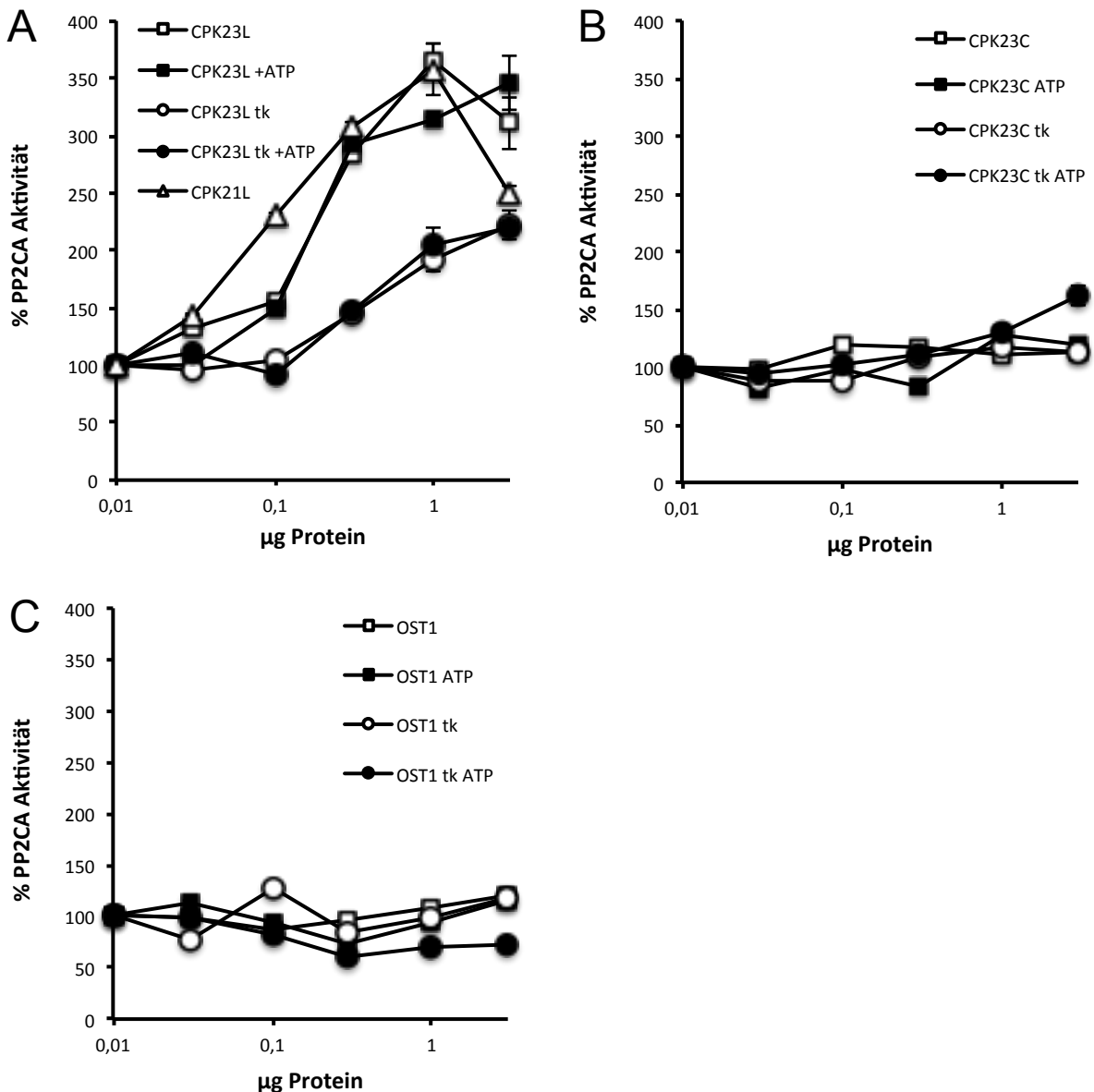


Abb. 3.31 PP2CA Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der Proteinkinasekonzentration

Im dargestellten Versuch wurde eine Proteinkinase-abhängige Aktivierung des Umsatzes von MUP Substrat durch die PP2CA Phosphatase analysiert. Dazu wurde 0,5 µg der PP2CA Proteinphosphatase mit steigender Proteinkinase-Konzentration in Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,9, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,3 mM MnCl₂) 20 Minuten bei 35°C mit und ohne 2 mM ATP vorinkubiert. Ebenfalls 5 Minuten bei 35°C vorinkubiertes 2 faches MUP Substrat wurde in schwarze 96 Well Microtiterplatten überführt und mit selbem Volumen an vorinkubierten Ansatz versetzt. Im Anschluss erfolgte die Messung im PlateReader bei einer Anregung von 360 nm und Emission von 460 nm für 20 Minuten. Dargestellt wurde die Aktivierung der Proteinphosphatase in % gegen die Proteinmenge der Proteinkinasen in [µg]. Es wurden in A) CPK23L, CPK23L tk mit und ohne ATP sowie CPK21 gemessen. In B) sind die Kurven von CPK23C, CPK23C tk ebenfalls mit und ohne ATP dargestellt. Gleiches wurde in C) für OST1 gemessen, n=8.

Dazu wurden Phosphataseansätze, wie in den Methoden beschrieben, mit jeweils Puffer, MUP Substrat und PP2CA Phosphatase gemischt und mit ansteigender Proteinmenge der jeweiligen Proteinkinase inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 35°C wurden die Ansätze im PlateReader ausgelesen um die Wechselwirkung zwischen Proteinkinase und Phosphatase zu analysieren. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.31 in Form von Titrationskurven dargestellt. Aufgetragen wurde die Phosphataseaktivität in Prozent gegen die steigende Proteinkinasekonzentration in [µg]. Da weder RCAR noch ABA im Ansatz verwendet wurden, konnte die Phosphatase ihre volle Aktivität, gemessen am Umsatz des zugesetzten MUP-Substrates, entfalten, welche auf 100% gesetzt wurde. In Abb. 3.31 A) ist die Titrationskurve der PP2CA Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der steigenden CPK23L Konzentration in Anwesenheit von ATP abgebildet (schwarze Quadrate). Parallel zur Zunahme der CPK23L Konzentration konnte eine Steigerung der PP2CA Phosphataseaktivität um das 3,5-fache beobachtet werden. Da nur PP2CA, Proteinkinase, ATP und MUP Substrat im Ansatz waren, bedeutete dies, dass die Phosphataseaktivität aufgrund des Zusatzes von CPK23L gestiegen war. Ob diese Steigerung der Aktivität eine Folge einer Interaktion beider Komponenten oder abhängig von einer Phosphorylierung der Phosphatase durch die Proteinkinase war, ist dabei noch offen. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde der Ansatz ohne zugesetztes ATP wiederholt (weiße Quadrate). Dabei verliefen die CPK23L Titrationskurven mit und ohne ATP fast identisch, woraus geschlossen werden konnte, dass die Aktivierung der Phosphatase nicht von einer Phosphorylierung durch CPK23L ausging. Um zu untersuchen, ob für diesen Effekt überhaupt eine aktive Proteinkinase benötigt wird, wurde der Versuch mit einer inaktiven CPK23L tk Version wiederholt (Kreise). Die gemessenen Titrationskurven der inaktiven CPK23L Proteinkinase mit und ohne ATP führten ebenfalls zu einem erhöhten Substratumsatz der Phosphatase, jedoch nur um den Faktor 2. Damit wurde die Annahme bestätigt, dass es sich um eine Interaktion zwischen Phosphatase und Proteinkinase handeln muss, die zur Aktivierung der Phosphatase führt. Im nächsten Schritt wurde diese Interaktion zwischen der PP2CA Phosphatase und der CPK21 Proteinkinase getestet und die erhaltene Titrationskurve

ebenfalls in Abbildung 3.31 A) dargestellt (Dreieck). Aus der Betrachtung des CPK21 Kurvenverlaufs wird eine zu CPK23L analoge Steigerung der PP2CA Aktivität ebenfalls um das 3,5-fache beobachtet, wodurch sich die schon vorher aufgefallene vergleichbare Regulation beider Proteinkinasen bestätigte. In Abbildung 3.31 B) und C) wurden die Proteinkinasen CPK23C und OST1, jeweils aktiv als auch inaktiv, bzw. mit und ohne ATP, auf ihre Interaktion mit PP2CA analysiert. Während für CPK23C eine marginale Steigerung der PP2CA Aktivität detektiert werden konnte, schwankten alle Werte der getesteten OST1 Versionen um die 100% Aktivitätsmarke von PP2CA.

Fasst man diese Resultate zusammen, kommt man zu dem Ergebnis, dass die Proteinkinasen CPK23C und OST1 keinen Einfluss auf die PP2CA Phosphataseaktivität nehmen, während CPK23L und CPK21 eine Aktivierung der PP2CA Phosphatase bewirken. Die beiden Proteinkinasen CPK23L und CPK21 scheinen als Katalysator der Phosphatase zu fungieren, ohne dass dazu ihre Aktivität benötigt wurde. Dies wirft die Frage auf, inwiefern die stark homologen Proteinkinasen CPK23L, CPK23C sowie CPK21 als positive oder negative Regulatoren Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion nehmen können. Um dies genauer zu untersuchen, wurde wieder auf das *in vivo* Protoplastensystem zurückgegriffen.

3.7 Regulation der ABA-Signaltransduktion durch die CPK Proteinkinasen

Nach aktuellem Stand der Forschung wurde den Proteinkinasen CPK23, CPK21 und OST1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Stomata zugeschrieben, jedoch nicht in der ABA-abhängigen Genregulation (Schulz *et al.*, 2013; Boudsocq und Sheen, 2013; Yoshida *et al.*, 2015). Bisher verdichteten sich die Hinweise auf CPK23 als einen positiven Regulator des ABA-Signalwegs. Die Protoplastenanalysen, die zu diesem Ergebnis führten, erfolgten in der Regel nach einem gängigen Protokoll mit einer Inkubationszeit von 16 Stunden über Nacht (Czap, 2015).

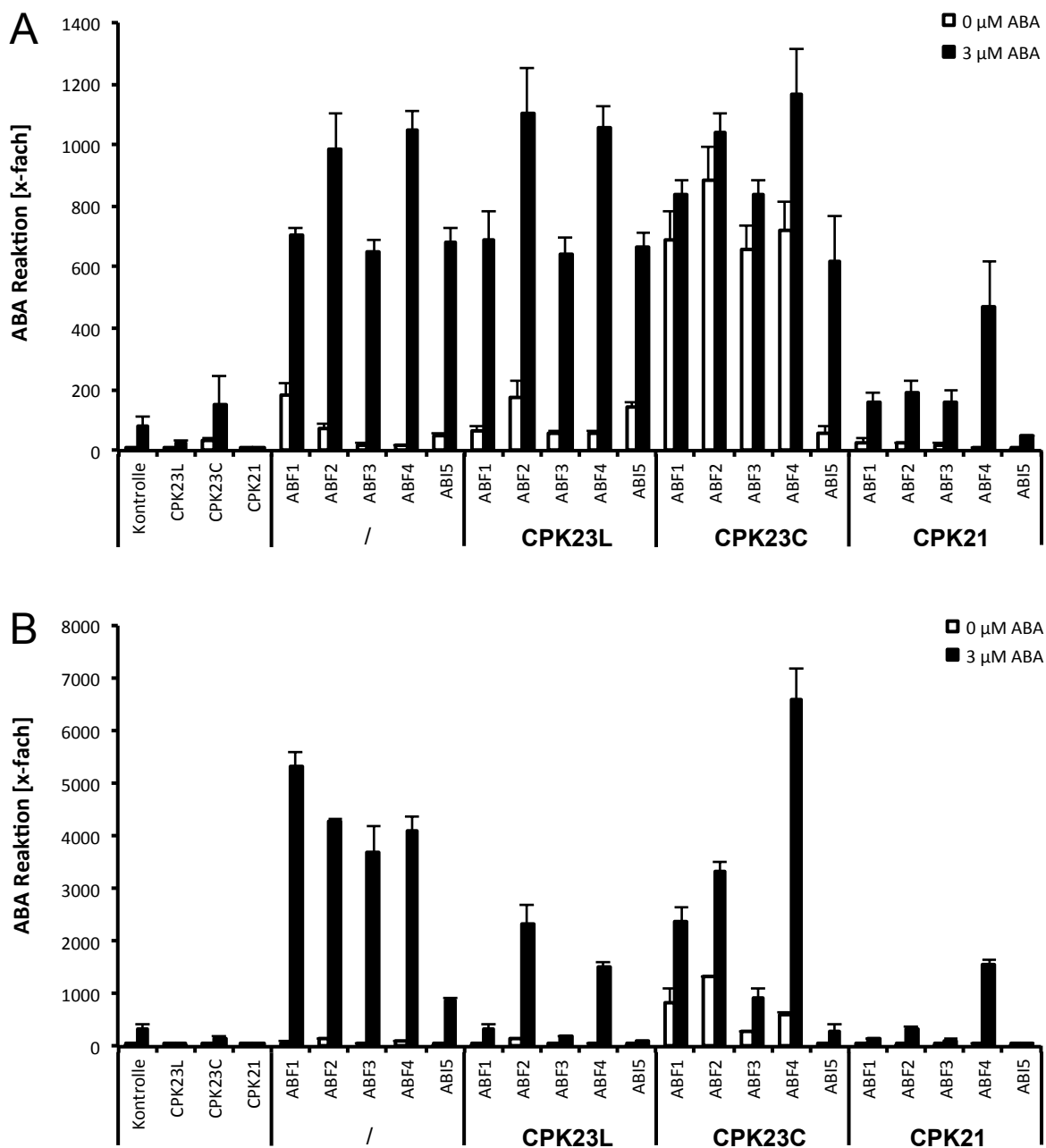


Abb. 3.32 Transiente Koexpression der CPKs und der ABF Transkriptionsfaktoren

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten durch Koexpression der CPK Proteinkinasen CPK23L, CPK23C sowie CPK21 mit den ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 sowie ABI5. Für alle Ansätze wurden 3 µg GUS-, 9 µg LUC-, 3 µg ABF- sowie 3 µg CPK-DNA verwendet. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 µM ABA bzw. Puffer induziert. Die Messung der Luciferase Aktivität erfolgte in A) nach 16 h, n=6, in B) nach 6 h, n=12 am Luminometer.

In Abbildung 3.32 A) ist der Effekt von CPK23L, CPK23C und CPK21 auf die ABA-abhängige Induktion der ABF Transkriptionsfaktoren mit einer Inkubationszeit von 16 Stunden dargestellt. Für diese Messung wurden Col-0 Protoplasten vorbereitet, welche mit 3 µg GUS-, 9 µg LUC- und je 3 µg ABF- bzw. 3 µg Proteinkinase-DNA transfiziert wurden. Die aus der Messung erhaltenen Daten wurden in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben, wobei schwarze Balken die Induktionswerte in Anwesenheit von ABA darstellen, während weiße Balken die gemessenen Werte ohne ABA abbilden. Zur Schaffung von Bezugswerten wurden sowohl die Proteinkinasen als auch die ABF Transkriptionsfaktoren getrennt voneinander transfiziert und deren Induktionswerte in den ersten Balken des Diagramms illustriert. Im Anschluss daran sind die Induktionswerte der verschiedenen Kombinationen von Proteinkinase und Transkriptionsfaktor aufgetragen.

Bei Betrachtung der Kontrollbalken von CPK23L, CPK23C und CPK21 konnte nur für CPK23C eine leicht positive Regulation der ABA-Antwort detektiert werden, wohingegen die Kontrollen der ABF Transkriptionsfaktoren alle eine deutliche Induktion von rund 1000-fach bewirkten. Eine zu den ABFs identische ABA-Antwort konnte für die Kombination von CPK23L mit den ABF Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Es scheint, dass CPK23L nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden keinen Effekt auf die ABF-induzierten Werte hatte. Vergleicht man jedoch diese Werte mit den Induktionszahlen der Kombinationen aus ABF und CPK23C, lässt sich eine positive Regulation erkennen. Während in Anwesenheit von ABA nur eine leichte Induktion gegenüber den ABF Bezugswerten gemessen wurde, erhöhten sich die Induktionszahlen ohne ABA aufgrund von CPK23C um das 12-fache. Dies verdeutlicht, dass CPK23C ein Regulator war, der es schaffte die ABA-Antwort nach 16 Stunden Inkubationszeit ABA-unabhängig zu induzieren. Im Kontrast dazu stehen die Induktionswerte der Koexpression von ABF und CPK21, welche deutlich niedriger als die gemessenen ABF Bezugswerte ausfielen. Selbst nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden konnte für die Kotransfektion von CPK21 mit den ABF Transkriptionsfaktoren eine negative Regulation der ABA-abhängigen Genexpression um das 3-fache nachgewiesen werden.

Da es für Pflanzen essentiell ist sich schnell an Stresssituation anzupassen, sollte die ABA-abhängige Regulation der Genexpression besonders zeitnah erfolgen. Aus diesem Grund ist die Betrachtung der Genexpression nach nur 6 Stunden Inkubationszeit von großem Interesse. Infolgedessen wurde oben gezeigter Versuch mit einer Induktionszeit von 6h wiederholt und das Ergebnis in Abb. 3.32 B) in

Form eines Balkendiagramms dargestellt. Um auch hier Bezugswerte zu schaffen, wurden die Proteinkinasen sowie die Transkriptionsfaktoren getrennt transfiziert und die erhaltenen Daten in den ersten Balken des Diagramms abgebildet. Schwarze Balken stehen für ABA induzierte Werte, während weiße Balken die Situation ohne ABA widerspiegeln. Bei Betrachtung der ABA-Antwort der CPK Proteinkinasen CPK23L, CPK23C sowie CPK21 konnten bereits nach 6 Stunden Inkubationszeit identische Werte zur 16 h Messung beobachtet werden. Dabei änderte sich auch das Verhältnis der CPKs untereinander nicht. Hingegen zeigten die Induktionswerte der Transkriptionsfaktoren, mit Ausnahme von ABI5, nach nur 6 Stunden Inkubation eine durchschnittliche 5-fache Zunahme im Vergleich zur längeren Inkubationszeit. Dies allein ermöglichte schon eine genauere Auswertung der Regulationsunterschiede der Kotransfektionen von CPK und ABF. Wie aus Abbildung 3.32 B) deutlich hervor geht, konnte eine negative Regulation der Transkriptionsfaktoren durch Koexpression von CPK23L detektiert werden. Dabei wurde die ABF induzierte ABA-Antwort unterschiedlich stark inhibiert. Während die Induktion von ABF1 durch CPK23L auf 6%, von ABF3 auf 5% sowie von ABI5 auf 10% des Bezugswerts reduziert wurde, führte die Koexpression mit CPK23L und ABF2 noch zu einer 55%igen ABA-Antwort, für ABF4 reichte es noch zu einer 37%igen Induktion. Eine noch stärkere Inhibierung der ABA-Antwort erfolgte durch die Kotransfektion der Transkriptionsfaktoren mit CPK21. So konnten für ABF1, ABF2, ABF3 sowie ABI5 nur noch zwischen 3% und 8% der Bezugswerte detektiert werden. Allein ABF4 zeigte eine zu CPK23L vergleichbare Induktion von noch 38% der ursprünglichen ABA-Antwort. Im Vergleich zu diesen Zahlen fällt die Koexpression von CPK23C mit den Transkriptionsfaktoren eindeutig aus der Reihe. Zum einen wurde die Induktion alle ABFs in einem geringeren Maß unterdrückt, wobei die Extrema von ABF3 mit nur 25% und von ABF2 mit 78% des Bezugswerts bestimmt wurden. Zum anderen fand sogar eine positive Regulation des ABF4 Transkriptionsfaktors durch Koexpression mit CPK23C um 60% statt. Dieses ambivalente Verhalten der CPK23C Proteinkinase wirft Fragen zum genauen Regulationsmechanismus dieser Proteinkinase auf. Denn selbst ohne ABA ist diese Proteinkinase in der Lage die ABA-abhängige Genexpression nach nur 6 Stunden Inkubationszeit um das 10-fache zu induzieren. Dies bedeutet, dass die Pflanze eine Antwort auf Stress gibt ohne gestresst zu sein. Diese Reaktion zu vermitteln war aber nur CPK23C in der Lage, während CPK23L eine Antwort auf Stress inhibierte. Was aber ist nun für das unterschiedliche Regulationsverhalten der CPK23L und CPK23C Proteinkinasen verantwortlich? Um auf diese Frage eine Antwort zu finden, wurde der N-terminale Bereich dieser Proteine genauer untersucht, da in diesem Bereich des Proteins die größten Divergenzen liegen. Dazu wurden N-terminale Verkürzungen der Proteinkinasen CPK23L und CPK23C hergestellt und sowohl deren Aktivität als auch Regulation analysiert.

3.8 Untersuchung der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C

Der N-Terminus der CPK Proteine ist zum einen für die Lokalisation von Bedeutung, zum anderen vermittelt er die Substratspezifität der Proteinkinasen (Ito *et al.*, 2010; Martin und Busconi, 2000). Genau in diesem Bereich befinden sich die größten Divergenzen der Aminosäuresequenz von CPK23L und CPK23C (siehe Abb. 3.8). Aus diesem Grund liegt der Fokus dieses Kapitels auf der Untersuchung der N-Termini dieser Proteinkinasen. Dazu wurden N-terminale Verkürzungen des Proteins sowohl im Proteinexpressionsvektor pQE70 als auch im pSK Vektor zur *in vivo* Analyse kloniert. Der N-Terminus beider Proteine wurde um 14, 32, 58 und 64 Aminosäuren verkürzt. Die daraus entstandenen Proteinvarianten werden im Folgenden mit $\Delta 14$, $\Delta 32$, $\Delta 58$ und $\Delta 64$ gekennzeichnet.

3.8.1 *in vitro* Analyse der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C

Zu Beginn der Untersuchung wurden die N-terminalen Verkürzungen des pQE Vektors verwendet und die Proteine rekombinant aus *E.coli* gereinigt. Leider konnten nicht alle verkürzten Varianten gereinigt werden, denn je länger die Verkürzung wurde, desto schwieriger gestaltete sich ihre Reinigung. Trotzdem konnten alle CPK23L Varianten und die ersten beiden CPK23C Varianten in einem radioaktiven Aktivitätstest auf ihre Proteinkinaseaktivität untersucht werden. Da aufgrund der schlechten Reinigungsbedingungen nicht alle Varianten die für den Aktivitätstest wünschenswerte Konzentration erreichten, wurden die eingesetzten Proteinmengen anhand eines Autoradiogramms sowie eines Western Blots bestimmt (Abb. 3.33).

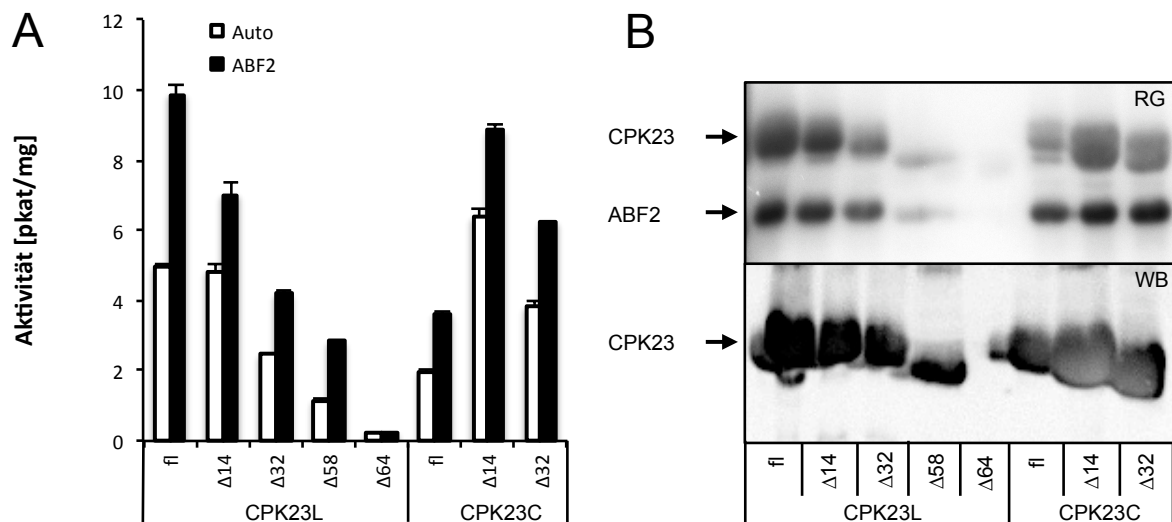


Abb. 3.33 Aktivität der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C

Radioaktiver Aktivitätstest der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C. Die radioaktive Aktivitätsmessung wurde in einem 20 µl Ansatz mit Proteinkinase im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 µM freies Calcium) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM ATP (0,25 µCi γ-³²P-ATP) gestartet und nach 30 Minuten Inkubation bei RT durch Zugabe von 20% H₃PO₄ gestoppt. Jede Messung wurde mit 3 technischen Replikaten durchgeführt. A) stellt die im Szintillationszähler gemessene Aktivität in pico-Katal pro mg der einzelnen Varianten dar. Da die Proteinkinasen nur in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden konnten, wurde zusätzlich ein Autoradiogramm (RG) der Aktivitätsmessung und zur Kontrolle der Proteinkonzentration ein Western Blot (WB) der eingesetzten Proteinmengen, abgebildet in B), durchgeführt.

In Abbildung 3.33 A) ist das Ergebnis des Aktivitätstests aller gereinigten CPK23L und CPK23C Varianten in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Dabei sind die Werte der Autophosphorylierung der Proteinkinasen in weißen Balken abgebildet, während schwarze Balken zusätzlich die Phosphorylierung des Substrats ABF2 beinhalten. Zur Kontrolle der Aktivität der N-terminalen Verkürzungen wurden auch die Proteine in voller Länge (fl) gemessen. Bis auf die Δ64 Variante der CPK23L Proteinkinase schienen alle Proteine aktiv zu sein und in der Lage endogenes Substrat wie ABF2 zu phosphorylieren. Es fällt jedoch auf, dass mit zunehmender Verkürzung des CPK23L Proteins dessen Aktivität abnahm. Vergleicht man die Messung mit den in Abb. 3.33 B) dargestellten Autoradiogramm und Western Blot wird offensichtlich, dass die abnehmende Aktivität mit der abnehmenden Proteinmenge korrelierte. Ebenso war dies für CPK23C der Fall. Für die volle Länge Version dieses Proteins wurde eine geringere Aktivität als die Δ14 Variante gemessen. Der korrespondierende Western Blot macht aber deutlich, dass dies an der niedrigeren Proteinmenge des CPK23C fl Proteins lag. Im Endeffekt hatten vermutlich alle Proteinkinasen eine vergleichbare Aktivität, da aber nicht alle Proteinkinasen in gleicher Konzentration in den Assay eingesetzt werden konnten, ergab sich dieser Unterschied in der gemessenen Aktivität. Um das Problem der rekombinanten Proteinreinigung zu umgehen und die Aktivität dieser Varianten *in vivo* zu untersuchen, wurden alle N-terminalen Verkürzungen in den pSK Protoplastenvektor kloniert.

3.8.2 *in vivo* Analyse der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C

Aus dem oben durchgeführten radioaktiven Aktivitätsversuch ließ sich die *in vitro* Aktivität der unterschiedlichen N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C ableiten, die für alle Varianten identisch schien. Was mit dieser Methode jedoch nicht gemessen werden konnte, ist die *in vivo* Aktivität dieser N-terminalen Verkürzungen und damit deren Einfluss auf den Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion. Um diesen genauer zu untersuchen, wurden alle N-terminalen Verkürzungen der CPK23L und CPK23C Proteine in den pSK Protoplastenvektor eingefügt, wovon jedoch die Varianten Δ32 CPK23L und Δ14 CPK23C nicht erzeugt werden konnten. Die im Protoplastensystem inaktiven Vollerlänge-Versionen (fl) der CPK Proteine wurden als Negativ-

Kontrollen eingesetzt, während die verkürzten (vk) Versionen als Positiv-Kontrollen fungierten (Sheen, 1996; Romeis *et al.*, 2001). Dazu wurden 3 µg DNA der neu klonierten Vektoren mit 3 µg GUS DNA und 9 µg LUC DNA zur Transfektion von vorbereiteten Col-0 Protoplasten verwendet. Diese wurden nach 6 Stunden Inkubationszeit am Luminometer gemessen und das Ergebnis in Abbildung 3.34 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Schwarze Balken stellen hierbei die Induktionswerte in Anwesenheit von ABA dar, während weiße Balken die Regulation ohne ABA wiedergeben. Untersucht wurde die Regulation der ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2 sowie ABF3 durch die N-terminalen Verkürzungen von CPK23L und CPK23C.

Um Bezugswerte zu schaffen wurden, die Transkriptionsfaktoren sowie die verschiedenen N-terminalen Varianten der Proteinkinasen getrennt transfiziert und in den ersten Balken des Diagramms illustriert. In Anwesenheit von ABA bewirkten alle untersuchten ABF Transkriptionsfaktoren eine Induktion der ABA-Antwort. Dabei erreichten ABF1 und ABF2 Induktionswerte von 3000-fach, während für ABF3 ein Induktionswert von 1800-fach detektiert wurde. Die Bezugswerte der CPK23L und CPK23C Varianten zeigten eine rund 150 – 170-fach induzierte ABA-Antwort. Allein CPK23L vk fiel besonders auf, da durch diese Proteinkinase die ABA-Antwort auf nur 9% des Induktionswerts der vollen Länge Version CPK23L gedrückt wurde. Zieht man den darunter liegenden Balken der $\Delta 14$ CPK23L vk in die Betrachtung mit ein, wird deutlich, dass die N-terminal verkürzte Version diesen Effekt wieder aufheben konnte. Auch die nachfolgenden N-terminalen Verkürzungen des CPK23L Proteins führten zu keiner negativen Regulation wie sie durch CPK23L vk hervorgerufen wurde. Diese Diskrepanzen konnten für CPK23C nicht detektiert werden. Obwohl eine leichte Reduktion der ABA-Antwort durch CPK23C vk erfolgte, stelle dieser Wert noch 76% des Induktionswerts der CPK23C fl Negativ-Kontrolle dar. Generell konnten keine gravierenden Unterschiede im Induktionsniveau aller CPK23C Varianten detektiert werden. Betrachtet man die Koexpression der CPK Varianten mit dem Transkriptionsfaktor ABF1, wiederholte sich das Balkenmuster der Bezugswerte der Proteinkinasen, jedoch auf einem höheren Induktionsniveau.

ERGEBNISSE

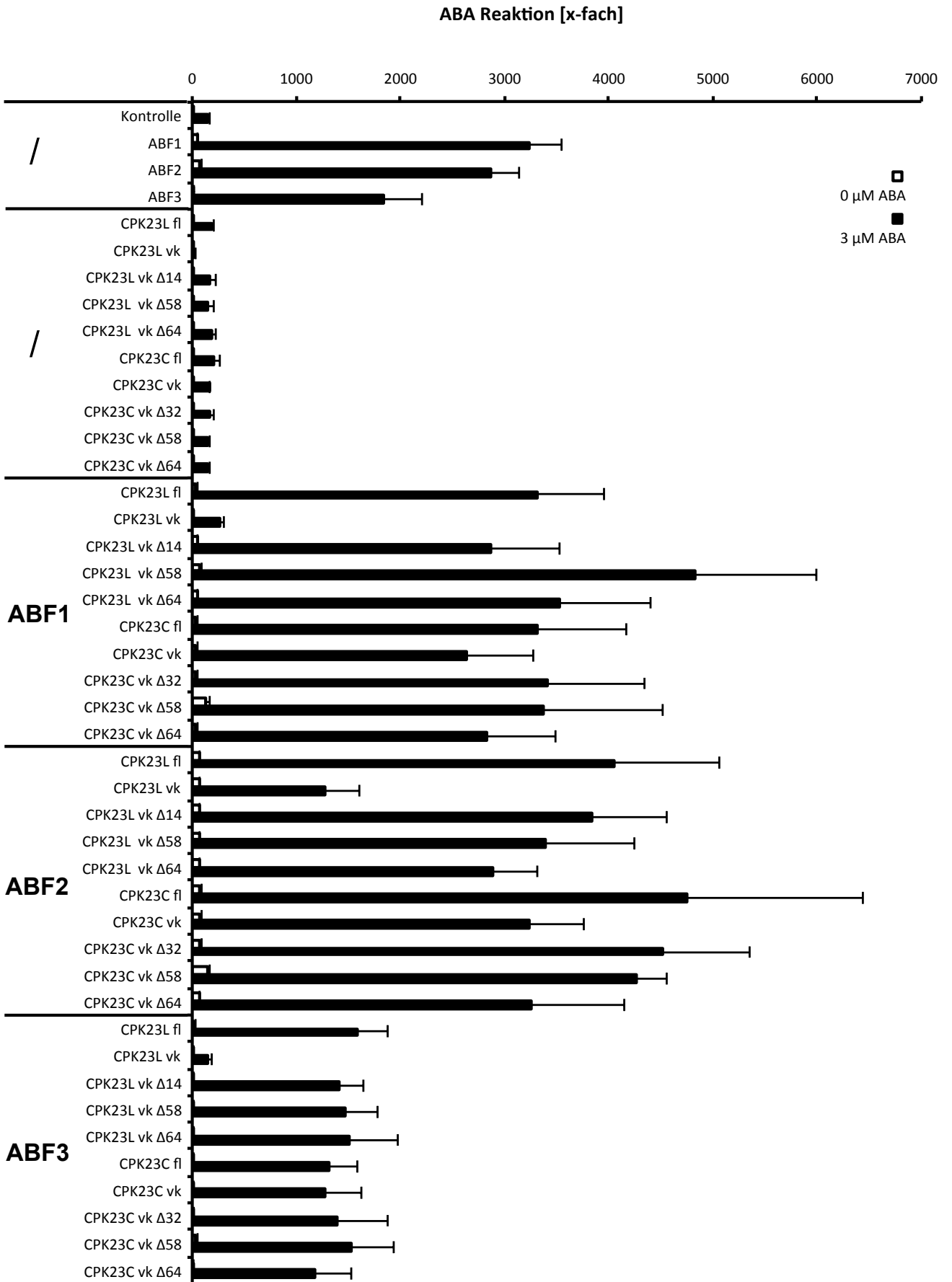


Abb. 3.34 Transiente Koexpression der N-terminalen Verkürzungen von CPK23L, CPK23C und den ABFs

Regulation des Rd29B::Luc Promotors in Col-0 Protoplasten durch Koexpression der N-terminale Verkürzungen der Proteinkinasen CPK23L fl, vk, $\Delta 14$, $\Delta 58$, $\Delta 64$ und CPK23C fl, vk, $\Delta 32$, $\Delta 58$, $\Delta 64$ mit den ABF Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2 und ABF3. Für alle Ansätze wurden 3 μg GUS DNA, 9 μg LUC DNA, 3 μg ABF sowie 3 μg CPK DNA verwendet. Die Ansätze wurden vor der Inkubationszeit geteilt und mit 3 μM ABA bzw. Puffer induziert. Die Messung der Luciferase Aktivität erfolgte nach 6 Stunden am Luminometer, n = 6.

Dabei hatte die volle Länge Version der CPK23L Proteinkinase keinen Effekt auf die ABF1 Induktion, wohingegen seine vk Version die ABA-Antwort auf rund 8% des Bezugswerts reduzierte. Diese negative Regulation konnte durch die nachfolgende, um 14 Aminosäuren verkürzte Version des Proteins wieder aufgehoben werden. Die darunter liegenden Balken der Koexpression von CPK23C mit ABF1 schwankten alle um den Wert der ABF1 Kontrollinduktion. Der in den Bezugswerten beobachtete Effekt zwischen CPK23C fl und CPK23C vk konnte auch in der Koexpression mit ABF1 reproduziert werden. Dabei führte die Kombination von CPK23C vk und ABF1 im Vergleich zur CPK23C vollen Länge zu einer rund 80%igen ABA-Antwort. Zur Vervollständigung der Analyse wurden ABF2 und ABF3 ebenfalls mit den N-terminalen Verkürzungen kotransfiziert und die erhaltenen Daten im Balkendiagramm abgebildet. Die schon vorher detektierten Regulationen von CPK23L vk und CPK23C vk zeigten sich auch in diesen ABF-induzierten ABA-Antworten. Dabei führte die Koexpression von CPK23L vk mit ABF2 zu einer 69%igen sowie mit ABF3 zu einer 90%igen Reduktion der ABA-Antwort in Vergleich zur vollen Länge. Auch der durch CPK23C vk induzierte Effekt hatte für ABF2 eine 32%ige sowie für ABF3 nur eine 4%ige Verringerung der Induktion im Bezug zur vollen Länge zur Folge. In allen Fällen konnte dieser Effekt durch die Verkürzung des Proteins um 14 Aminosäuren aufgehoben werden.

Zusammenfassend beweist dieser Versuch, dass CPK23L ein negativer Regulator der ABA-abhängigen Genregulation ist. Zu dieser Regulation sind die ersten 14 Aminosäuren des Proteins essentiell. Eine Verkürzung des CPK23L Proteins um diese Aminosäuren konnte die negative Regulation wieder aufheben und führte zu einem ähnlichen Verhalten wie es für CPK23C beobachtet wurde. In den ersten 14 Aminosäuren befindet sich sowohl eine Palmitoylierung- und Myristoylierungsstelle, von der die Lokalisation des Proteins abhängt, als auch eine Autophosphorylierungsstelle Serin⁶ des CPK23L Proteins. Diese Phosphorylierungsstelle konnte sowohl in CPK23L als auch in CPK21, welche beide als negative Regulatoren fungierten, jedoch nicht in CPK23C detektiert werden und sollte in Zukunft Objekt genauerer Untersuchungen sein (siehe Abb. 3.8).

4. DISKUSSION

Pflanzliche Nahrung stellt den Löwenanteil der Grundnahrungsmittel, die zum Überleben der Weltbevölkerung nötig ist. Zudem werden Pflanzen als Rohstoff, Futtermittel sowie zur Energiegewinnung eingesetzt, wodurch ein hoher Bedarf entsteht. Dieser allein kann nur durch die hochtechnologisierte Agrarkultur gedeckt werden. Durch den Klimawandel bedingte Überschwemmungen oder Dürren verursachen jedoch erhebliche Ertragseinbußen (Lobell und Field, 2007; Al-Kaisi *et al.*, 2013). Besonders Wassermangel ist ein gravierender Stressfaktor, dem die Pflanze als sessiler Organismus nicht entfliehen kann. Um zu Überleben muss die Pflanze einen Weg finden, mit wenig Wasser hauszuhalten (Cutler *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015). Aus diesem Grund wird eine, über das Phytohormon Abscisinsäure initiierte, schnelle Reaktion eingeleitet, welche innerhalb von Minuten zum Stomataschluss führt (Christmann *et al.*, 2006). Dabei wird eine Protein-Signalkaskade aktiviert, in die unter anderem die Proteinkinasen CPK23, CPK21 sowie OST1 involviert sind (Geiger *et al.*, 2010). Des Weiteren stellt die Pflanze unter Trockenstress auch ihr Genexpressionsmuster um (Boudsocq und Sheen, 2013). Ob auch in diesem Prozess die im Stomataschluss agierenden Proteinkinasen beteiligt sind und welchem Regulationsmechanismus sie unterliegen, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden (Schulz *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2015). Unter den Proteinkinasen der ABA-Signalkaskade befinden sich, neben der SnRK2 Proteinkinase OST1, auch die calciumabhängigen Proteinkinasen CPK23 und CPK21. Wie ihr Name bereits ausdrückt, kann die Aktivität dieser Proteinkinasen durch Calciumbindung beeinflusst werden. In welchem Ausmaß dies aber für CPK23 sowie CPK21 der Fall ist, soll im nachfolgenden Kapitel diskutiert werden.

4.1 Integriert CPK23 Calciumsignale in die ABA-Signaltransduktion?

Calcium ist ein sekundärer Botenstoff, der sowohl an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt ist als auch in biotischen und abiotischen Stresssituationen regulatorisch wirkt (Kudla *et al.*, 2010). Seinen Einfluss als präzise kontrollierbaren Botenstoff erhält Calcium durch die Möglichkeit einer schnellen, räumlich und zeitlich definierten Freisetzung sowie des anschließenden aktiven Exports aus der Zelle (Webb, 2013). Damit ein Signalstoff mehrere Stimuli beantworten kann, wird sein Signal in eine Oszillation bestehend aus Frequenz, Dauer und Amplitude übersetzt (McAinsh *et al.*, 1995). Genau diese Eigenschaften verhalten sich in der putativen CPK23L Überexpression-Pflanzenlinie *gca2* unterschiedlich zum Wildtyp, woraufhin ein verändertes Verhalten in der Regulation des Stomataschlusses beobachtet werden konnte (Allen *et al.*, 2001; Korte, 2009). Auf Basis dieser Studien scheint CPK23L das Drehkreuz zwischen Calciumregulation und ABA-Signaltransduktion zu sein. Ob diese Vermutungen den Tatsachen entsprechen, ist jedoch noch offen.

In mehreren Studien wurden die Calciumaffinitäten von verschiedenen Mitgliedern der CPK Familie untersucht. Die Calciumaffinität dieser Proteinkinasen beruht auf kanonischen EF Hand Sequenzen, welche eine spezielle strukturelle Faltung der Calmodulin-ähnlichen Domäne bewirken. Dabei bilden die EF Hand Sequenzen von EF1 und EF2 einen *N-lobe*, während EF3 und EF4 den *C-lobe* formieren. Beide *lobes* sind über zwei Helices CH1 und CH2 miteinander verbunden (Abb. 4.1). Nach Calciumbindung an die EF Hände brechen diese Helices, wodurch das aktive Zentrum der Proteinkinase zugänglich wird (siehe Abb. 1.7; Wernimont *et al.*, 2010).

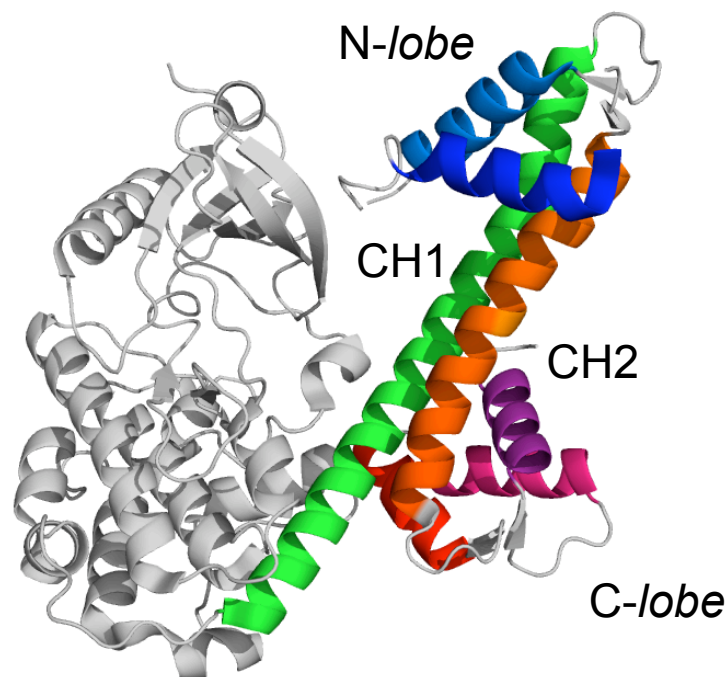


Abb. 4.1 Kristallstruktur der Proteinkinase CPK1 aus *Toxoplasma gondii*

Veranschaulichung der Calmodulin-ähnlichen Domäne anhand der Kristallstruktur von CPK1 aus *Toxoplasma gondii* (pdb: 3KU2; Wernimont *et al.*, 2011). Die Calmodulin-ähnliche Domäne wurde farblich hervorgehoben. Dabei bilden die Helices der EF Hände EF1 und EF2 den *N-lobe* (blaue Helices). Dieser ist über zwei Helices CH1 (grün) und CH2 (orange) mit dem *C-lobe* (rote Helices), bestehend aus EF3 und EF4, verbunden. Durch Calciumbindung an den EF Händen des N- und C-lobes brechen die Helices CH1 und CH2, wodurch es zu einer Konformationsänderung der Proteinkinase kommt und das aktive Zentrum der Kinase zugänglich wird. Die Struktur wurde mittels MacPyMOL erstellt.

In Boudsocq *et al.* (2012) wurden 14 Mitglieder dieser Proteinfamilie exprimiert und in Proteinkinase-Aktivitätstests *in vitro* auf ihre Calciumaffinitäten analysiert. Im Laufe der Untersuchung wurden drei Proteinkinasen bestimmt, CPK8, CPK10 sowie CPK32, welche sich nur schwach durch Calcium aktivieren ließen. Für CPK7, CPK13, CPK25 und CPK30 wurde keine Korrelation zwischen Calciumbindung und Aktivität beobachtet. Diese Proteinkinasen schienen, unabhängig zu der Anzahl an intakten kanonischen EF Händen, konstitutiv aktiv vorzuliegen. Während zum Beispiel CPK25 nur eine intakte EF Hand vorzuweisen hatte, wurde für CPK30 die volle Anzahl an funktionsfähigen EF Händen detektiert (Cheng *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung der Calciumbindung der in den ABA-Signalweg involvierten Proteinkinasen CPK23 und CPK21 in Geiger *et al.* (2010) wurde für CPK23 eine Basalaktivität von 60% nachgewiesen sowie für CPK21 eine stark durch Calcium induzierbare Titrationskurve mit einem K_D -Wert von 277 nM (Abb. 4.2 A). Übereinstimmende Aktivitätskurven konnten für die Calcium-Titrationskurven von CPK23L, CPK23C und CPK21 bestimmt werden. Hierbei lag der K_D -Wert von CPK21 bei rund 500 nM und für die CPK23 Proteinkinasen bei etwa 3 μ M. Mit einer Basalaktivität von CPK23L mit 70% sowie von CPK23C mit 40% sind diese Aktivierungskurven vergleichbar zu den schwach aktivierbaren CPK Proteinen in Boudsocq *et al.* (2012) und Geiger *et al.* (2010).

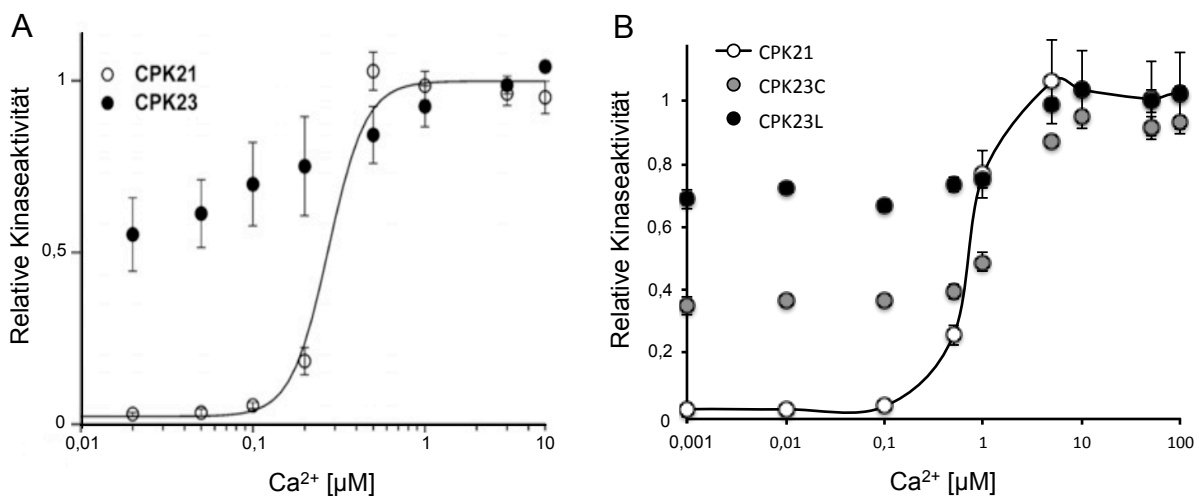


Abb. 4.2 Gemessene Ca^{2+} Affinität von CPK23 und CPK21

A) Darstellung der *in vitro* Aktivität von CPK23 und CPK21 in Abhängigkeit steigender Ca^{2+} Konzentrationen gemessen in einem radioaktiven Proteinkinase-Aktivitätstest. Die jeweils maximal detektierte Aktivität wurde auf den Wert 1 gesetzt. Während CPK23 bereits eine höhere Basalaktivität von rund 60% aufweist und deren Aktivität nur um das 2-fache durch Calcium induziert werden kann, zeigt die CPK21 Aktivität eine deutliche Induktion durch Calcium (entnommen aus Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., *et al.* (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein Proteinkinases with distinct Ca^{2+} affinities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 8023-8028. Abgedruckt mit der Erlaubnis von National Academy of Sciences, U.S.A). In B) wurden zum Vergleich die in dieser Arbeit gemessenen Titrationskurven aufgetragen (Abb. 3.7 A).

Ob diese schwächere Calciumaffinität durch die Anordnung der kanonischen EF Hände bestimmt wird, wurde durch einzelne EF Hand *knockout* Mutanten der CPK23L, CPK23C sowie CPK21 Proteine näher untersucht. Dazu wurden die EF Hände nacheinander mutiert, sodass eine Calciumbindung der einzelnen EF Hand nicht mehr möglich wurde. Zusätzlich zu diesen Mutationen wurden für CPK23L und CPK23C Varianten der ersten EF Hand hergestellt, welche mit der Aminosäuresequenz der ersten EF Hand aus CPK21 übereinstimmen (Abb. 3.6). Dadurch sollte untersucht werden, ob die starke Calciumaffinität von CPK21 durch Austausch der ersten EF Hand in CPK23L und CPK23C herbeigeführt werden kann. In Abbildung 3.7 B) und C) der CPK23L und CPK23C Varianten wurde gezeigt, dass die erste EF Hand essentiell für die von Calcium rund 2-fache Induktion der Aktivität ist. Eine Rückmutation der ersten Δ EF Hand in die Primärsequenz von CPK21 bewirkte eine Wiederherstellung der Induktion, jedoch nicht eine CPK21 ähnliche Calciumaffinität. Diese hohe Calciumaffinität von CPK21 konnte in Abb. 3.7 D) trotz der *knockout* Varianten in CPK21 Δ EF3 und Δ EF4 beobachtet werden. Die Veränderung der Calciumbindestellen in Δ EF1 führte nicht, wie in CPK23, zu einer calciumunabhängigen Basalaktivität, sondern zeigte ähnlich zu CPK21 Δ EF2 eine 8-fache calciumabhängige Induktion. Ein vergleichbarer Trend wurde bereits in Franz *et al.*, 2011 bei der Analyse der Calciumaffinität von CPK21 veröffentlicht, wobei die Relevanz des *N-lobes*, bestehend aus EF1 und EF2 (siehe Abb. 4.1), für die calciuminduzierbare Aktivität in den Vordergrund gestellt wurde. In dieser Studie wurde allerdings auch die Bedeutung des *C-lobes*, bestehend aus EF3 und EF4, untersucht. Wie in *mobility shift assays* der CPK Proteinkinasen in Anwesenheit von EGTA respektive Calcium gezeigt werden konnte, findet eine calciumabhängige Verschiebung der Proteinbanden im Gel statt (Harmon *et al.*, 1987; Romeis *et al.*, 2000). Diese konnte jedoch für die *knockout* Variante der dritten und vierten EF Hand von CPK21 nicht detektiert werden (Franz *et al.*, 2011). Da die Verschiebung der CPK Proteinbande im Gel auf einer calciumabhängigen Konformationsänderung mit einhergehender Aktivierung beruht, wird angenommen, dass die Bindung von Calcium am *C-lobe* essentiell für diese Regulation ist.

Die calciumabhängige Änderung der Konformation kann aber auch durch weitere Methoden bestimmt werden. So wird durch die Verwendung eines *switch-sensors* die dynamische Reaktion eines auf einem Gold-Chip fixierten Proteins in Abhängigkeit verschiedener Calciumpuffer analysiert. Dies wurde für CPK23L sowie CPK21 durchgeführt und die erhaltenen Kurven in Abb. 3.5 dargestellt. Für beide calciumabhängigen Titrationskurven wurde eine Veränderung in der dynamischen Reaktion der Proteine und damit in deren Proteingröße und Konformation detektiert. Jedoch führte die Titration mit Calcium für CPK23L zu einer Zunahme der dynamischen Reaktion, während die dynamische Reaktion von CPK21 mit steigender Calciumkonzentration abnahm. Übertragen auf die Proteingröße entspricht dies einer radialen Verkleinerung von CPK23L und somit einer Vergrößerung des dynamischen Radius von CPK21. Dieses gegenläufige Verhalten wirft Fragen auf, da aufgrund der

stark homologen Primärsequenz der Proteine von einer übereinstimmenden Proteinstruktur ausgegangen wird. In Wernimont *et al.* (2011) wurde diese Struktur in Form einer Kristallstruktur von *Toxoplasma gondii* TgCPK1, sowohl im Zustand mit als auch ohne gebundenen Calciumionen, illustriert und der Faltungsmechanismus anhand eines Schemas erläutert (Abb. 1.7; Abb. 4.1). Essentiell für eine Konformationsänderung sind die mit Calcium komplexierten EF Hände des *C-lobes* EF3 und EF4. Möglicherweise liegt in diesen EF Händen die Lösung auf die Frage der unterschiedlichen Calciumaffinitäten von CPK23 und CPK21, was auf einen unterschiedlichen *C-lobe* abhängigen Faltungsmechanismus beider Proteine hindeutet. Es wäre möglich, dass CPK23L durch die Bindung von Calcium an EF3 und EF4 sich in einem Zustand befindet, in dem die Helices CH1 und CH2 bereits vorgefaltet vorliegen (Abb. 1.7 B; Abb. 4.1). Eine weitere Bindung von Calcium an den *N-lobe* des Proteins führt daraufhin zu der detektierten Konformationsänderung, welche eine verkleinerte Oberfläche der CPK23L Proteinkinase zur Folge hat. Im Gegensatz dazu liegen die CH1 und CH2 Helices in CPK21 ohne Calcium in voller Länge vor, wodurch sich ein kompakteres Volumen ergibt als in Anwesenheit von Calcium. Dies würde auch mit der detektierten Proteinkinaseaktivität übereinstimmen. Während das aktive Zentrum von CPK23L durch bereits ohne Calcium gefaltete Helices zugänglich wird, also eine Basalaktivität aufweist, ist das aktive Zentrum der CPK21 Proteinkinase durch die CH1 und CH2 Helices deutlich gegen Substrate abgeschirmt, was nur durch die Zugabe von Calcium verändert werden kann. Vergleicht man die Primärsequenzen der EF3 und EF4 Hand von CPK23L und CPK21 tritt eine Aminosäure besonders hervor (Abb. 3.8). An der Position CPK21 Serin⁴⁶⁸ befindet sich eine Autophosphorylierungsstelle, wo an gleicher Stelle in CPK23L ein Asparagin vorliegt. Dieser Ladungsunterschied zwischen einer polaren, ungeladenen Aminosäure und einer negativ geladenen, phosphorylierten Aminosäure könnte sowohl Einfluss auf die Sekundärstruktur und somit auf den Faltmechanismus der CPK Proteine nehmen als auch auf die Bindungsaffinität des Calciumions. Aus diesem Grund wurde versucht die Bindungsaffinitäten der einzelnen EF Hände der Proteine CPK23L und CPK21 mittels ITC zu bestimmen.

Ein besonderes Erkennungsmerkmal der Mitglieder der CPK Familie ist die C-terminal gelegene Calmodulin-ähnliche Domäne. Für das synthetische Calmodulin mit vier intakten kanonischen EF Hand Sequenzen konnten mittels ITC Bindungsaffinitäten von 0,54 μM , 0,82 μM , 2,3 μM und 10 μM bestimmt werden, welche jedoch durch weitere Ionen wie 5 mM Magnesium verändert werden konnten (Gilli *et al.*, 1998). Durch diese zusätzlichen Ionen wurden die Dissoziationskonstanten hin zu 0,66 μM , 1,6 μM , 4,6 μM und 76,9 μM verschoben, welche den mittels ITC gemessenen Bindungsaffinitäten von CPK21 von 45 nM, 1,3 μM , 3,1 μM sowie 120 μM in dieser Arbeit sehr nahe kommen (Abb. 3.4). Allein die Extrema von 45 nM und 120 μM fallen leicht aus dem Rahmen, da sie vermutlich durch Primär- sowie Sekundärstruktur der CPK21 Proteinkinase beeinflusst werden.

Durch diese Bindungsaffinitäten wird vermutet, dass es auch *in vivo* zu einer calciumabhängigen Aktivierung von CPK21 kommen kann, während CPK23L aufgrund von geringeren Bindungsaffinitäten nur durch sehr hohe Calciumkonzentrationen um das Zweifache aktiviert wird. Obwohl die zu Beginn dieses Kapitels gestellte Frage, ob CPK23 ein Drehkreuz zwischen Calciumregulation und ABA-Signaltransduktion darstellt, nicht eindeutig beantwortet werden kann, drängt sich die Tatsache auf, dass CPK21 in der Lage ist sensitiv auf Calcium zu reagieren und dementsprechend im ABA-Signalweg aktiv zu werden. Ob diese calciumabhängige Aktivierung jedoch notwendig ist, wurde bis jetzt nicht ausreichend untersucht.

Generell müsste die untergeordnete Rolle der CPK Aktivierung durch die cytosolische Calciumkonzentration überdacht werden. Wie in einer jüngsten Studie gezeigt wurde, steht die calciumabhängige Proteinkinase CPK28 *upstream* des PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) induzierenden Calciumanstiegs (Monaghan *et al.*, 2015). Wird eine Pflanze von Pathogenen befallen, induziert PAMP einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration, gefolgt von einem Anstieg von ROS (*reactive oxygen species*) (Ranf *et al.*, 2011). Die hohe Konzentration beider sekundärer Botenstoffe bewirkt die PAMP-induzierte Immunität (PTI) der Pflanze, wobei die plasmamembran-assoziierte cytoplasmatische Proteinkinase BIK1 eine zentrale Rolle im Immunsystem der Pflanze einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteinkinase für den PAMP-induzierten Calciumanstieg essentiell ist und ein Substrat von CPK28 darstellt (Ranf *et al.*, 2014). CPK28 ist zwar eine calciumabhängige Proteinkinase, zeigte jedoch auch bereits unter basalen cytosolischen Calciumkonzentrationen Aktivität *in vivo*, welche zu einem Abbau der BIK1 Proteinkinase führte (Matschi *et al.*, 2013; Monaghan *et al.*, 2014). Dadurch fungierte CPK28 als negativer Regulator von BIK1 und dem von BIK1-abhängigen cytosolischen Calciumanstieg (Monaghan *et al.*, 2015). Dieses Fallbeispiel eröffnet neue Perspektiven auf das Zusammenspiel zwischen den calciumabhängigen Proteinkinasen des ABA-Signalwegs und der ABA-induzierten Calciumsignatur. Obwohl CPK28 *in vitro* durch Calcium stark induziert werden konnte (Matschi *et al.*, 2013), ist es *in vivo* bereits bei basalen cytosolischen Konzentrationen aktiv und kontrolliert den BIK1 Abbau und damit auch die cytosolische Calciumkonzentration (Monaghan *et al.*, 2015). Möglicherweise könnte dies für die Proteinkinasen CPK21 und CPK23 ebenfalls zutreffen. In Untersuchungen einer Quadrupel-Mutante der CPK Proteine *cpk5/6/11/23* wurde eine Beteiligung dieser Proteine in der calciumabhängigen Regulation der Stomata nachgewiesen (Brandt *et al.*, 2015). Während CPK23 *in vitro* nur gering durch Calcium aktiviert werden kann, wurde für CPK5 und CPK11 eine starke Aktivierung durch Calcium gezeigt (Geiger *et al.*, 2009; Boudsocq *et al.*, 2012). In der Mutante dieser CPKs *cpk5/6/11/23* konnte weder durch ABA-Zusatz noch durch Calciumapplikation eine Aktivierung des SLAC1 Ionenkanals nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Abhängigkeit des calciumabhängigen Signalwegs vom calciumunabhängigen SnRK2 Signalweg nachgewiesen (Brandt *et al.*, 2015). Diese neuen

Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob Calcium auf die *in vivo* Aktivität der CPK Proteine Einfluss nehmen kann oder, *vice versa*, die Calciumsignatur durch die CPK Proteine determiniert wird und in welchem Umfang sich diese Signatur auf den Abscisinsäure-Signalweg auswirkt.

Ein Forschungsbereich, auf den bisher kaum in der Diskussion des ABA-Signalwegs eingegangen wurde, ist der Tag-Nacht-Rhythmus der Pflanze (*circadian clock*). Obwohl ein Effekt des Phytohormons ABA auf diesen Zyklus bereits nachgewiesen wurde (Seung *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 2009), ist der Zusammenhang zwischen *circadian clock* und ABA-Regulation noch nicht völlig aufgeklärt. Neben den Anpassungen an Stressfaktoren muss sich die Pflanze auch auf die täglich ändernden Licht- und Temperaturverhältnisse einstellen, welche zum Beispiel die Jahreszeiten mit sich bringen (Eriksson und Millar, 2003). Dabei findet eine Modulation von Expressionsmustern statt, die sich in Dauer, Phase, Amplitude und Genauigkeit einteilen lassen. Diese Signatur kann durch die Phytohormone Cytokinin, Auxin, Gibberelin, Brassinosteroid und Abscisinsäure verändert werden (Hanano *et al.*, 2006). So akkumulieren die Phytohormone Cytokinin, Auxin und ABA im Verlauf eines Tages (Novakova *et al.*, 2005). Laut Tallman (2004) nimmt dabei die ABA-Konzentration in den Schließzellen der Stomata während der Lichtphase ab, um offene Stomata und eine damit einhergehende Photosynthese zu unterstützen. Bei Dunkelheit sollten die Stomata geschlossen bleiben, wodurch eine erhöhte Konzentration von ABA in den Schließzellen vermutet wurde (Tallman, 2004). Dieser präzise Zyklus konnte jedoch *in vivo* nicht detektiert werden. Vielmehr wurden Schwankungen der endogenen ABA-Konzentration gemessen, die sich in Maxima nach einer Stunde, 10 Stunden und 18 Stunden ausdrückten, wobei das letzte Maximum, nach drei Stunden in Dunkelheit, die höchste Amplitude aufwies (Novakova *et al.*, 2005). Neben diesen endogenen ABA-Konzentrationen wurde auch der Einfluss exogenen ABAs auf die *circadian clock* untersucht. Dabei führte eine exogene ABA-Applikation unter Dauerlicht zu einer Verlängerung der Periode des Tag-Nacht-Rhythmus, was für die zyklische Expression von CCR2 (*cold- and circadian-regulated 2*) einer Verschiebung um 2,2 Stunden im Vergleich zur Kontrolle entsprach (Hanano *et al.*, 2006). Diese zyklische Modulation von ABA ist besonders relevant für die Erklärung der Diskrepanz der in den in Abbildung 3.32 gezeigten Ergebnissen. Mit der Verkürzung der Induktionszeit der transfizierten Protoplasten von 16 auf 6 Stunden konnten deutliche Effekte der CPK23L und CPK21 Proteinkinasen auf die Induktion der ABA-Antwort nachgewiesen werden, die in der Messung nach 16 Stunden Inkubationszeit im Fall von CPK23L nicht mehr bzw. für CPK21 in einer abgeschwächten Form detektiert werden konnten. Die verkürzte Inkubationszeit bewirkte, dass beide Proteinkinasen als negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion identifiziert wurden. Warum dies im Fall der längeren Inkubationszeit nicht möglich war, könnte zum einen an der über den langen Zeitraum verringerten Expression oder des Abbaus der transfizierten Komponenten liegen, zum anderen könnten die Ergebnisse durch den Einfluss der *circadian clock* verändert worden sein. So wurde für

den Transkriptionsfaktor ABI3 eine Interaktion mit TOC1 (*timing of cab2 expression 1*) bzw. AIP1 (*ABI3 interacting protein 1*) nachgewiesen, welches eine wichtige Komponente der *circadian clock* in Arabidopsis ist (Kurup *et al.*, 2000; Abb. 4.3). Zusätzlich agiert ABI3 jedoch auch im ABA-Signalweg, indem es in der Lage ist mit ABF1, ABF3, ABF4 und ABI5 zu interagieren bzw. im Fall von ABI5 dessen Expression zu kontrollieren (Finkelstein *et al.*, 2005; Reeves *et al.*, 2011). Durch ABI3 kann ein Zusammenhang zwischen der *circadian clock* und der ABA-Signaltransduktion hergestellt werden, dessen Einfluss auf beide Signalwege es in Zukunft genauer zu untersuchen gilt und der möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse der veränderten Inkubationszeit erklären kann.

Worauf sowohl ABA als auch die *circadian clock* ebenfalls Einfluss nehmen, ist die cytosolische Calciumkonzentration (Webb und Hetherington, 1997; Dodd *et al.*, 2005; Imaizumi *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2004). Ein Großteil der zellulären Informationen werden in Calciumsignaturen übersetzt, die sich durch Frequenz, Dauer und Amplitude unterscheiden (Allen *et al.*, 2001). Neben diesen oft nur Sekunden bis Minuten andauernden Signalen wurde allerdings auch eine langsame Calciumoszillation detektiert, welche sich über einen Tag hinzieht und durch Lichtintensität und Tagesdauer beeinflusst werden kann (Johnson *et al.*, 1995; Love *et al.*, 2004). Diese Calciumoszillation wird durch die Konzentration der zyklischen ADP-Ribose (cADPR) kontrolliert, welche wiederum durch die Komponenten des Tag-Nacht-Zyklus CCA1 (*circadian clock associated 1*), LHY (*late elongated hypocotyl*), PRRs (*pseudo-response regulators*), TOC1 (*timing of cab2 expression 1*) und GI (*gigantea*) beeinflusst wird (siehe Abbildung 4.3; Imaizumi *et al.*, 2007).

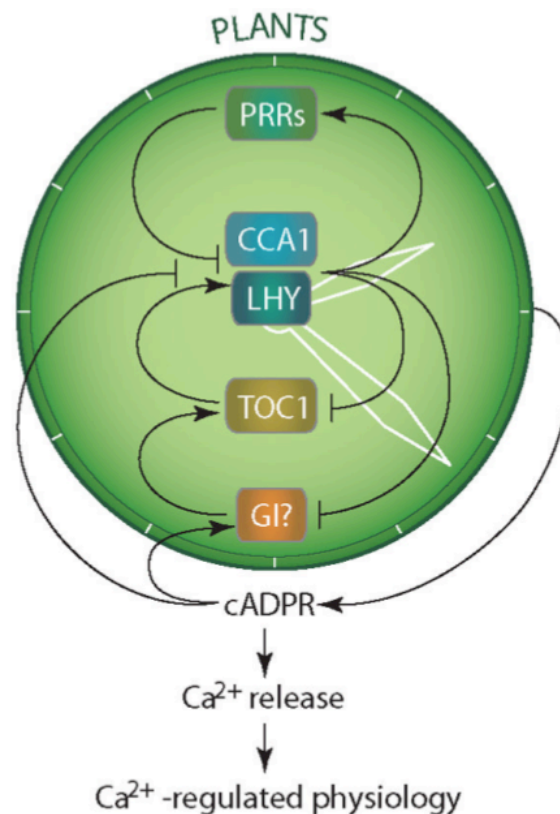


Abb. 4.3 Regulationsmechanismus der *circadian clock* in Pflanze

An der Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus der Pflanze sind die Komponenten CCA1 (*circadian clock associated 1*), LHY (*late elongated hypocotyl*), PRRs (*pseudo-response regulators*), TOC1 (*timing of cab2 expression 1*) und GI (*gigantea*) beteiligt, welche die Konzentration der zyklischen ADP-Ribose (cADPR) und dadurch die physiologische Ca^{2+} Konzentration regulieren (Aus Imaizumi, T., Kay, S.A. und Schroeder, J.I. (2007). *Circadian rhythms: Daily watch on Metabolism. Science 318, 1730-1731.* Abgedruckt mit der Erlaubnis von AAAS).

Ebenfalls über die cADPR-Konzentration greift ABA in die Calciumregulation ein, indem ABA das Enzym der ADPR-Zyklase aktiviert, welches cADPR synthetisieren kann (Sanchez *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2003). Rund 28% der ABA-abhängigen Gene in Arabidopsis werden durch cADPR reguliert, wodurch die ABA-Antwort auf molekularer und physiologischer Ebene beeinflusst wird. So wurde eine Induktion des ABF1 Transkripts sowie der PP2C Proteinphosphatasen, aber auch einiger Serin/Threonin Proteinkinasen durch ABA und cADPR detektiert (Sanchez *et al.*, 2004). Ebenso wurden Proteine des Calciumsignalwegs und des Calciumtransports unter diesen Bedingungen verstärkt exprimiert (Sanchez *et al.*, 2004). Dies erhärtet die Vermutung, dass über Calcium und ABA auch calciumabhängige Proteinkinasen in die Regulation der *circadian clock* involviert sein könnten (Jaworski *et al.*, 2003). Das genaue Zusammenspiel zwischen Calciumsignatur, *circadian clock* und ABA-Signalweg gilt es jedoch noch zu entschlüsseln sowie den calciumabhängigen Proteinkinasen eine definierte Rolle zuzuweisen.

4.2 Einfluss der CPKs auf die ABA-Signaltransduktion

Neben der Calciumbindedomäne besitzen die calciumabhängigen Proteinkinasen eine Serin/Threonin Kinase Domäne, die es ihnen ermöglicht Substrate zu phosphorylieren und dadurch zu regulieren. Eine zentrale Komponente dieser Arbeit war es endogene Substrate der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 sowie OST1 zu bestimmen und deren Phosphorylierungsstellen genauer zu charakterisieren. Bei diesen Untersuchungen wurde zu Beginn die Interaktion zwischen RCAR Proteinen und Proteinkinasen des ABA-Signalwegs analysiert. Die deutlichsten Phosphorylierungen waren für RCAR9, RCAR10 und RCAR11 detektiert worden (Abb. 3.12), woraufhin ihre genauen Phosphorylierungsstellen bestimmt wurden (Abb. 3.13). Anschließend wurden diese durch Phosphomimikry Varianten auf ihre Bedeutung und Funktion genauer untersucht.

Die Auswertung der *in vivo* Protoplasten-Experimente ergab für die RCAR Proteine der Unterfamilie II RCAR9 und RCAR10 jeweils zwei auffällige Aminosäuren im Bereich der hoch konservierten *gate* und *latch* Regionen (Abbildung 4.4 A; Peterson *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2010). So hatten RCAR9 Serin¹¹⁶ sowie RCAR10 Serin¹⁰⁷, welche beide das konservierte Serin der *gate* Region darstellen, sowie RCAR9 Serin^{138/140} D und RCAR10 Serin^{129/131} D, welche zwischen *gate* und *latch* Region liegen, eine deutliche Reduktion der ABA-Antwort zur Folge (Abb. 3.15). Beide RCAR Proteine sind Vertreter der Unterfamilie II, welche als Monomer vorliegen und eine höhere Affinität zum ABA-Liganden aufweisen als Vertreter der Untergruppe III (Szostkiewicz *et al.*, 2010; Dupeux *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2011). Für den untersuchten Vertreter der Untergruppe III, RCAR11, konnte keine Phosphorylierung an diesen konservierten Positionen nachgewiesen werden. Möglicherweise beruht dies auf der Ausbildung von Homodimeren und der damit einhergehenden Abschottung von potentiellen Phosphorylierungsstellen (Nishimura *et al.*, 2009). Dafür wurden drei Alanin Substitutionen an RCAR11 Serin⁴⁷, Serin⁶⁶ sowie Threonin¹⁰⁶ gefunden, welche alle die ABA-Antwort negativ regulierten. Ebenfalls eine negative Regulation rief die Phosphorylierungsmimikry RCAR11 Serin¹²² D hervor. Diese relevanten Phosphorylierungsstellen wurden in der in Abbildung 4.4 gezeigten Kristallstruktur des Komplexes aus HAB1 und RCAR11 hervorgehoben. Da für RCAR9 und RCAR10 keine Kristallstruktur vorlag sowie für RCAR8 keine Kristallstruktur des Komplexes aus RCAR8 und Proteinphosphatase, wurden die in RCAR9 und RCAR10 gefundenen Phosphorylierungsstellen an die konservierten Positionen in RCAR11 übertragen. Die Phosphorylierungsstellen von RCAR9 Serin¹¹⁶ und RCAR10 Serin¹⁰⁷ (RCAR11 Serin⁸⁵) liegen dabei an der Interaktionsfläche von RCAR und Proteinphosphatase, wodurch zum einen deren Bindung, zum anderen auch die katalytische Domäne der Phosphatase beeinflusst werden könnte (Abb. 4.4 C). Es ist denkbar, dass Mutationen an dieser Position die Bindung von RCAR an die Proteinphosphatasen unterdrücken, was das Fehlen der ABA-abhängigen Induktion in Abb. 3.15 erklären würde. Über Veränderung der Bindung des ABA-Moleküls an die ABA-Bindetasche könnten die Phosphorylierungen an RCAR9 Serin¹²³ und RCAR10 Serin¹¹⁴ (RCAR11 Serin⁹³) sowie RCAR9 Serin^{138/140} und RCAR10 Serin^{129/131} (RCAR11 Glycin¹⁰⁷/Serin¹⁰⁹) einen Effekt auf die ABA-Regulation nehmen. Zur Veranschaulichung wurden die an der Bindung des ABA-Moleküls involvierten Aminosäuren Lysin⁵⁹ und Glutamat¹⁴¹ blau gekennzeichnet (Raghavendra *et al.*, 2010; Abb. 4.4 D und E). Alle für RCAR11 *in vivo* identifizierten relevanten Phosphorylierungsstellen liegen in der Nähe der ABA-Bindetasche (Abb. 4.4 E). Damit lässt sich die für RCAR11 Serin¹²² D gefundene Verschiebung der ABA-abhängigen Inhibierung der Phosphatase erklären, indem die Phosphorylierung an dieser Position möglicherweise die Affinität von ABA an die Bindetasche herabsetzt.

A

	<u>LIG/PP2C</u>	<u>gate</u>	<u>latch</u> <u>LIG/PP2C</u>
RCAR1	62 YK P FV S RCTV	85 V K SGL P ATT S TER	116 D H R L K N Y S S I L T
RCAR2	64 YK P F I S R CTV	87 V K SGL P ATT S TER	118 D H R L K N Y S S I L T
RCAR3	60 YK P F I S R CVV	83 V K SGL P ATR S TER	114 D H R L K N Y S S I I S
RCAR4	55 YK P F I S R CVV	79 L K SGL P AT K S T EV	110 D H R L K N Y S S T I S
RCAR5	38 Y K Q F V K T C N L	62 V V SGL P A E F S R E R	93 D H R L V N Y R S K T M
RCAR6	38 F K H F V K T C K L	62 V V S D L P A S F S L E R	93 D H R L V N Y Q S K T T
RCAR7	37 Y Q R F V K S C T M	67 L V S G F P A D F S T E R	98 N H R L V N Y K S K T K
RCAR8	86 Y K N F I R Q C R I	111 V V SGL P A V S S T E R	142 D H R L K N Y R S V T T
RCAR9	89 Y K H F V K S C H V	114 V V S G L P A A F S L E R	145 D H R L M N Y K S V T T
RCAR10	80 Y K H F L K S C S V	105 V V S G L P A A S S T E R	136 D H R L S N Y R S V T T
RCAR11	58 Y K H F I K S C S V	83 V I SGL P A N T S T E R	114 E H R L T N Y K S V T T
RCAR12	85 Y K H F I K S C N V	110 V I SGL P A N T S R E R	141 E H R L R N Y K S V T T
RCAR13	78 Y K H F I K S C T I	107 V V SGL P A S T S V E I	138 E H R L N N Y R S V T S
RCAR14	63 Y K H F V K R C R L	87 V I SGL P A S T S T E R	118 E H R L K N Y K S V T S

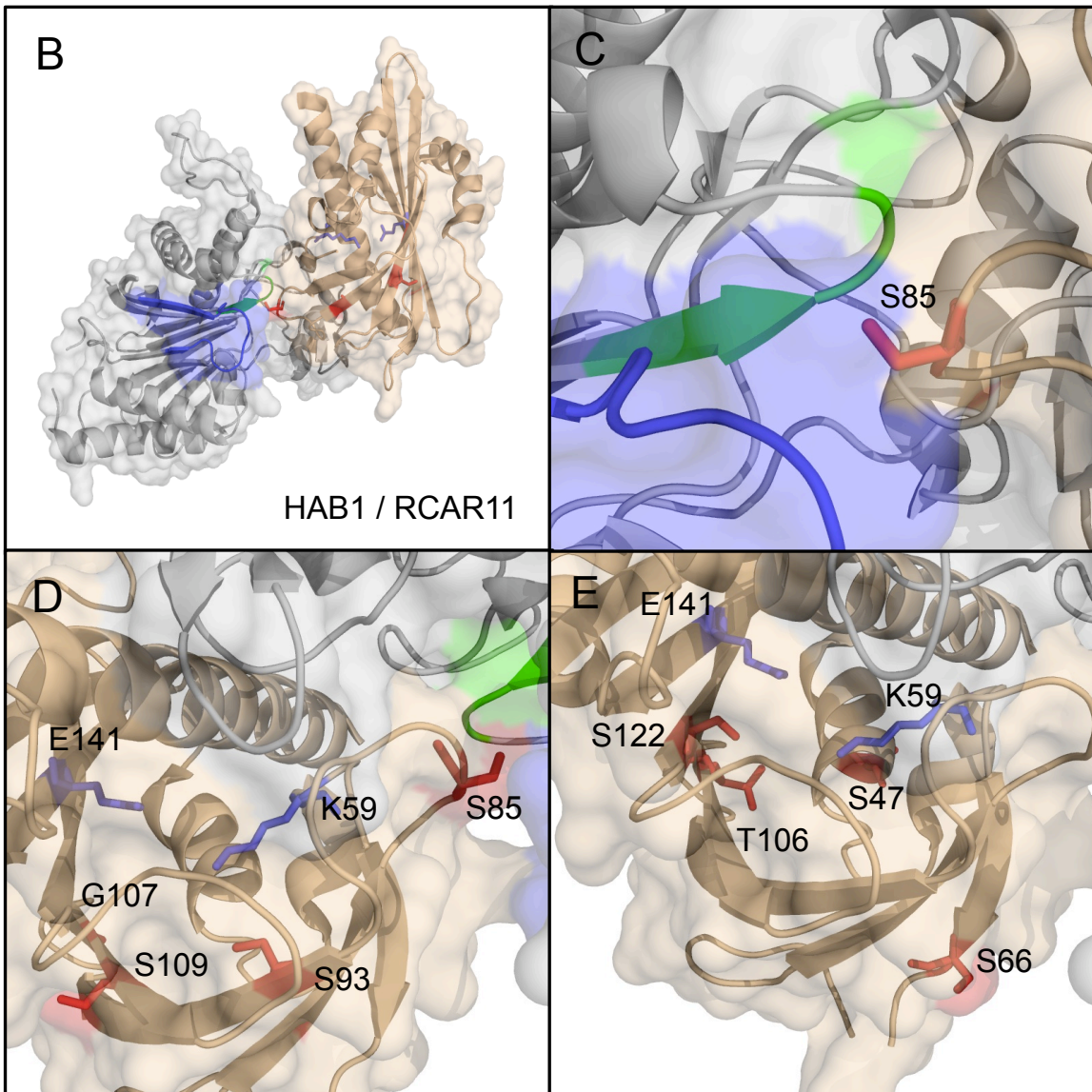


Abb. 4.4 Sequenzalignment aller RCAR Proteine und Kristallstruktur von HAB1 und RCAR11

A) Darstellung der RCAR Domänen für Ligandenbindung und PP2C-Interaktion in Form eines Alignments der Primärsequenzen. Aminosäuren, welche durch die Proteinkinasen phosphoryliert wurden, sind rot dargestellt. Die genauen Phosphorylierungsdaten befinden sich im Anhang. Konservierte Aminosäuren aller Unterfamilien sind schwarz hinterlegt, während konservierte Aminosäuren der Unterfamilie I gelb sowie der Unterfamilie III grün markiert wurden. In den Fällen, in denen konservierte Aminosäuren in zwei Unterfamilien auftraten, wurden sie türkis hinterlegt. B) Kristallstruktur der Proteine HAB1 (grau) und RCAR11 (gold) im Komplex (pdb: 3QN1). In HAB1 wurde die Interaktionsfläche mit den RCAR Proteinen blau hervorgehoben sowie die naheliegende katalytische Domäne grün. Phosphorylierte Aminosäuren im RCAR11 Protein wurden als rote *sticks* dargestellt. Die in die Bindung des ABA Moleküls involvierten Aminosäuren K59 und E141 wurden als blaue *sticks* abgebildet (Raghavendra *et al.*, 2010). C) Vergrößerung des Interaktionsbereichs zwischen HAB1 und RCAR11 Protein zur Verdeutlichung des Einflusses der Phosphorylierungsstelle an RCAR11 Serin⁸⁵, welche in RCAR9 Serin¹¹⁶ und RCAR10 Serin¹⁰⁷ zu einer Inhibierung der ABA-Antwort führt. D) Anordnung der Phosphorylierungsstellen von RCAR9 und RCAR10 übertragen auf die RCAR11 Struktur. E) Anordnung der in RCAR11 gefundenen Phosphorylierungsstellen, welche *in vivo* Einfluss auf die ABA-Antwort zeigten. Die Strukturen wurden mittels MacPyMOL erstellt.

Bei genauerer Untersuchung der RCAR11 *phosphosite* Varianten Serin⁴⁷ A, Serin⁶⁶ A, Threonin¹⁰⁶ A sowie Serin¹²² D mit PP2CA in einem Phosphatase-Aktivitätstest wurde kein Einfluss der Alanin Substitutionen festgestellt, jedoch ein bedeutender Effekt der RCAR11 Serin¹²² D Variante. Dieses konservierte Serin liegt in einer Binderegion des Liganden und beeinflusste stark die ABA-abhängige Inhibierung der Phosphatase. So wurde eine 10-fach geringere Affinität zu ABA detektiert, was zu einer verzögerten Inhibierung der Phosphatase führte. Der Absolutwert der Inhibierung wurde jedoch nicht durch diese Mutation verändert wie es für andere RCAR11 Mutationen beobachtet werden konnte (Mosquna *et al.*, 2011). In jener Studie wurden verschiedene Aminosäuren der RCAR11 Liganden- und Proteinphosphatasen-Interaktionsbereiche auf ihre Relevanz für die RCAR Aktivität analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass bereits der Austausch einer Aminosäure an RCAR11 zu einer ABA-unabhängigen Inhibierung der Proteinphosphatasen führte. Eine Kombination der Aminosäuren Histidin⁶⁰ P, Valin⁸³ F und Phenylalanin¹⁵⁹ V war ausreichend, um eine konstitutiv aktive Version von RCAR11 zu erzeugen. Die übertragenen Mutationen in RCAR14 bewirkten, sogar in Abwesenheit von ABA, im Samen eine ABA-abhängige Antwort. Ebenfalls wurden in dieser Studie verschiedene Mutationen des RCAR11 Serin¹²² untersucht. Jedoch konnte hierbei keine konstitutive Aktivierung des RCAR11 Rezeptors aufgrund der Mutationen detektiert werden (Mosquna *et al.*, 2011). Dies stimmt mit den in Abbildung 3.17 enthaltenen Daten überein, da eine Phosphorylierung dieses Serins nicht zu einer konstitutiven Aktivität von RCAR11 führte, sondern zu einer verzögerten. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinasen des ABA-Signalwegs durch Phosphorylierung von RCAR11 Serin¹²² *in vivo* Einfluss auf die ABA-Antwort nehmen können sowie *in vitro* die Inhibierung der PP2CA Phosphatase verzögern. Dieses Erkenntnis stellt die übergeordnete Dominanz der Proteinphosphatasen in der ABA-Signaltransduktion in Frage und betont die Bedeutung der Proteinkinasen in der Feinregulation der Signalkaskade.

In dieser Feinjustierung spielen auch die unterschiedlichen RCAR Proteine an sich eine entscheidende Rolle. Bisher ist es noch unklar, unter welchen speziellen Voraussetzungen ein bestimmter RCAR ABA-Rezeptor eine korrespondierende Phosphatase inhibiert. In Abbildung 3.26 und 3.27 wurden die RCAR Proteine RCAR9, RCAR10, RCAR11, RCAR13 und RCAR14 *in vitro* auf ihre Phosphorylierung durch die Proteinkinasen des ABA-Signalwegs in Anwesenheit der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 untersucht. In den Autoradiogrammen wurden deutliche Unterschiede zwischen den RCAR Proteinen beobachtet, die nicht im Zusammenhang zu ihrer Angehörigkeit einer Unterfamilie standen. Zum Beispiel wurden RCAR9, RCAR10 und RCAR11 durch die Proteinkinase CPK21 phosphoryliert, eine Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatasen konnte jedoch nur für RCAR9 und PP2CA ohne ABA beobachtet werden (Abb. 3.27). Im Gegensatz dazu wurden die RCAR Proteine RCAR13 und RCAR14 nur in Anwesenheit von ABI1 durch CPK21 phosphoryliert bzw. konstant von den Phosphatasen ABI2, PP2CA und HAB1 dephosphoryliert. Da dies sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ABA der Fall war, wird ein Einfluss der Homo-Dimerisierung ausgeschlossen. In einem Phosphatase-Aktivitätstest in Hao *et al.*, (2011) wurden diese RCAR Proteine auf ihre ABA-unabhängige Inhibierung verschiedener Phosphatasen untersucht. Dabei konnte nur RCAR9 eine konzentrationsabhängige Inhibierung ohne ABA bewirken, während für RCAR10, RCAR11, RCAR13 und RCAR14 eine klare Diskrepanz zwischen der Inhibierung mit und ohne ABA beobachtet wurde (Hao *et al.*, 2011). Eine mögliche Ursache für diese abweichenden Ergebnisse könnten die im Proteinkinase-Aktivitätstest anwesenden Proteinkinasen sein, welche im Phosphatase-Assay in Hao *et al.* (2011) nicht verwendet wurden. Es scheint, dass auch hier die Proteinkinasen eine Wirkung auf die ABA-Abhängigkeit der RCAR Proteine haben.

Neben den RCAR Proteinen wurden auch die Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2 (AREB1), ABF3, ABF4 (AREB2) sowie ABI5 als Substrate der Proteinkinasen im ABA-Signalweg bestimmt. Eine Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch eine ABA-abhängige Proteinkinase wurde in Furihata *et al.* (2006) bereits nachgewiesen. In jener Studie wurden Aminosäuren der konservierten Phosphorylierungssequenz R-X-X-S/T respektive S/T-X-X-E/D *in vivo* auf ihren Einfluss auf die ABA-Antwort untersucht. Die Phosphorylierungsstellen wurden dabei theoretisch anhand der bekannten Phosphorylierungssequenz bestimmt (Abb. 4.5).

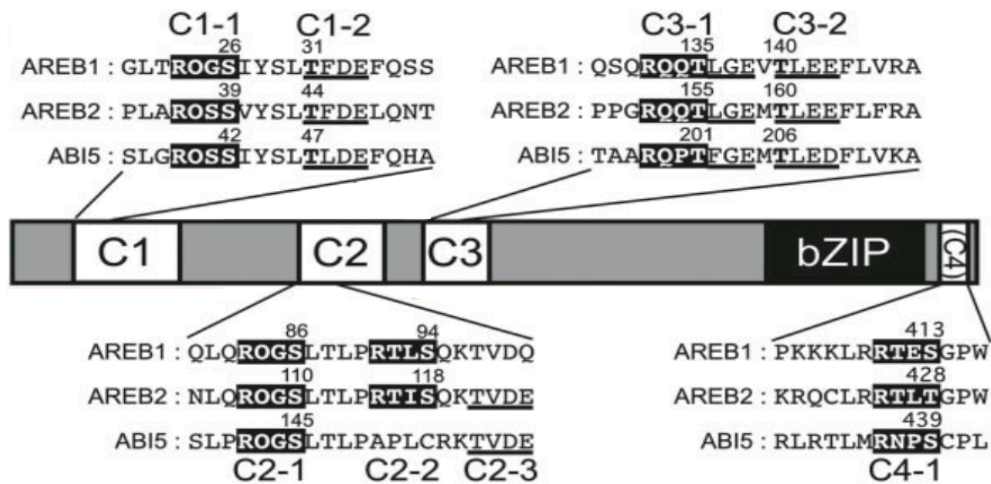


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der ABF Domänenstruktur

Darstellung der ABF Domänenstruktur. Der schwarze Bereich gibt die bZIP Domäne zur DNA Bindung wieder. In Weiß wurden die konservierten Bereiche hervorgehoben (C1 – C4), wobei putative Phosphorylierungsstellen der Sequenzmuster R-X-X-S/T respektive S/T-X-X-E/D in der dargestellten Primärsequenz schwarz hinterlegt sind. Hierbei entspricht AREB1 dem ABF2 Protein und AREB2 der ABF4 Sequenz. Eine Darstellung der Phosphorylierungsstellen in Form von 3D Strukturen ist aufgrund fehlender Kristallstrukturen nicht möglich. (entnommen aus Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1988–1993. Abgedruckt mit der Erlaubnis von National Academy of Sciences, U.S.A).

Ein Großteil dieser putativen Phosphorylierungsstellen konnte durch massenspektrometrische Analyse, der durch die Proteinkinasen des ABA-Signalwegs phosphorylierten Transkriptionsfaktoren, bestätigt werden. So wurden für ABF4 (AREB2) alle bis auf Serin¹¹⁸ in Furihata *et al.* (2006) beschriebene Phosphorylierungsstellen gefunden (Abb. 3.19). Zudem wurden aber auch weitere Phosphorylierungsstellen der Transkriptionsfaktoren detektiert, welche nicht dem Sequenzmustern R-X-X-S/T respektive S/T-X-X-E/D entsprachen, wie ABF2 Serin⁴, ABF1 Threonin²⁴⁰ aber auch ein konserviertes Serin ABF2 Serin⁴⁵, welches bis auf ABI5 in allen Transkriptionsfaktoren phosphoryliert vorlag. Eine dreidimensionale Darstellung der gefundenen Phosphorylierungsstellen ist aufgrund fehlender Kristallstrukturen der ABF Transkriptionsfaktoren nicht möglich. Zur detaillierteren Analyse wurden die *phosphosite* Mutationen von ABF1, ABF2 und ABF3 *in vivo* im transienten Protoplasten-Expressionssystem untersucht (Abb. 3.20). Das Ergebnis dieser Untersuchung hob besonders die Aminosäuren ABF1 Threonin³ D, ABF2 Serin⁴⁵ A sowie ABF2 Serin⁹⁴ A hervor, da für ABF1 Threonin³ D und ABF2 Serin⁴⁵ A keine Induktion der ABA-Antwort detektiert werden konnte sowie für ABF2 Serin⁹⁴ A eine deutlich verringerte Induktion (Abb. 3.20). Letzte Phosphorylierungsstelle wird durch die Untersuchung in Furihata *et al.* (2006) gestützt, in der eine völlige Inhibierung der Phosphorylierung für die Kombination von ABF2 (AREB1) Serin⁹⁴ A mit Serin⁸⁶ A detektiert wurde.

Um den Effekt der Proteinkinasen auf die ABF-abhängige Induktion der ABA-Antwort zu bestimmen, wurden nacheinander die beteiligten Proteinkinasen in Kotransfektion mit den *phosphosite* Mutationen der ABF1, ABF2 und ABF3 Transkriptionsfaktoren untersucht (Abb. 3.21 bis Abb. 3.24). Bei der Betrachtung der Ergebnisse von CPK21 zeigte sich eine deutliche Inhibierung der ABF-induzierten ABA-Antwort aller untersuchten ABF1 und ABF3 *phosphosite* Mutationen (Abb. 3.23). Die Koexpression der ABF2 P-Varianten mit CPK21 führte ebenfalls zu einer Inhibierung der ABA-Antwort, jedoch konnte diese negative Regulation durch die Mutation an ABF2 Threonin³¹ D komplett aufgehoben werden. Ein ähnliches Bild ergab sich für CPK23L, wobei auch hier ABF2 Threonin³¹ A/D sowie ABF2 Serin⁹⁴ D die Inhibierung der ABA-Antwort durch die Proteinkinase verhinderten (Abb. 3.21). Anscheinend ermöglicht die permanente Phosphorylierungsmimikry an diesen Aminosäuren einen konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktor zu imitieren. Eine Steigerung der ABF-induzierten ABA-Antwort im transienten Expressionssystem wurde durch die Koexpression der ABF *phosphosite* Mutationen mit OST1 beobachtet (Abb. 3.24). Dadurch wurde die Funktion des bereits bekannten positiven Regulators der ABA-Signaltransduktion bestätigt (Czap, 2015; Yoshida *et al.*, 2015). Die Koexpression der Transkriptionsfaktoren mit CPK23C führte einerseits zu einer rund zweifachen Inhibierung der ABA-Antwort bei ABF1, jedoch zu einer rund zweifachen Steigerung der ABA-Induktion bei ABF2 (Abb. 3.22). Zudem bewirkte die Kotransfektion mit CPK23C einen starken Anstieg der Induktionswerte in Abwesenheit von ABA, die besonders in ABF2 Threonin³¹ D ausgeprägt war. Dies bedeutet, dass schon allein die Anwesenheit von CPK23C zu einer Induktion der ABA-Antwort führte, ohne dass das Phytohormon ABA zugesetzt wurde. Eine ähnliche Wirkung zeigte auch ABF1 Threonin³³ sowie ABF2 Threonin³¹ in Koexpression mit OST1. Veränderungen an diesen Aminosäuren bewirkten entweder eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors oder eine Aufhebung der Inhibierung. Eine solche Aktivierung eines Transkriptionsfaktors wurde für den Kälte- und Trockenstress induzierbaren Transkriptionsfaktor DREB2A nachgewiesen, indem ein Deletion der Aminosäuren 136-165 vorgenommen wurde, woraufhin der Transkriptionsfaktor eine konstitutive Aktivität aufwies (Sakuma *et al.*, 2006). Diese deletierten Aminosäuren bestanden zu 38% aus Serinen und Threoninen, was die Vermutung nahe legt, dass die Inhibierung über eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung durch Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen übertragen wurde.

Da PP2C Proteinphosphatasen die ABA-Signalkaskade negativ regulieren, wurden auch diese Proteine auf ihre genauen Phosphorylierungsstellen durch die Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion hin untersucht. Eine Interaktion mit der SnRK2 Proteinkinase OST1 konnte bereits nachgewiesen werden (Hirayama und Umezawa, 2010; Soon *et al.*, 2012).

DISKUSSION

A

	RCAR (a)	CD	RCAR (b)	RCAR (c)
ABI1	139 PEMEDAVST	176 YDGHGGS	237 PETV	296 KVIQWNGARVFCVLAMSRSTI
ABI2	126 PEMEDSVST	164 YDGHGGS	227 PETV	286 KVIRWNGARVFCVLAMSRSTI
HAB1	200 SEMEDAFAV	242 YDGHGGH	322 SETV	381 KVIQWQGARVFCVLAMSRSTI
HAB2	199 SEMEDAVRA	241 YDGHGGA	322 PETV	381 KVIQWQGARVFCVLAMSRSTI
AHG1	120 RKMEDSVTV	148 YDGHGGS	227 AAIS	286 RVLVVDGARVEGILATSRAI
PP2CA	115 RDMEDAVSI	141 FDGHGCS	217 CDAV	276 RVIYWDGARVLCVLAMSRSTI
HAI1	122 REMEDAVAV	152 YDGHGCS	217 CDAV	276 RVIYWDGPRVLCVLAMSRSTI
HAI2	131 RDMEDAVAL	161 YDGHGCS	229 CDAV	288 RVIYWDGARVLCVLAMSRSTI
HAI3	88 REMEDAVAI	116 YDGHGCS	186 CDSV	245 RVIYWDCPRVLCVLAMSRSTI

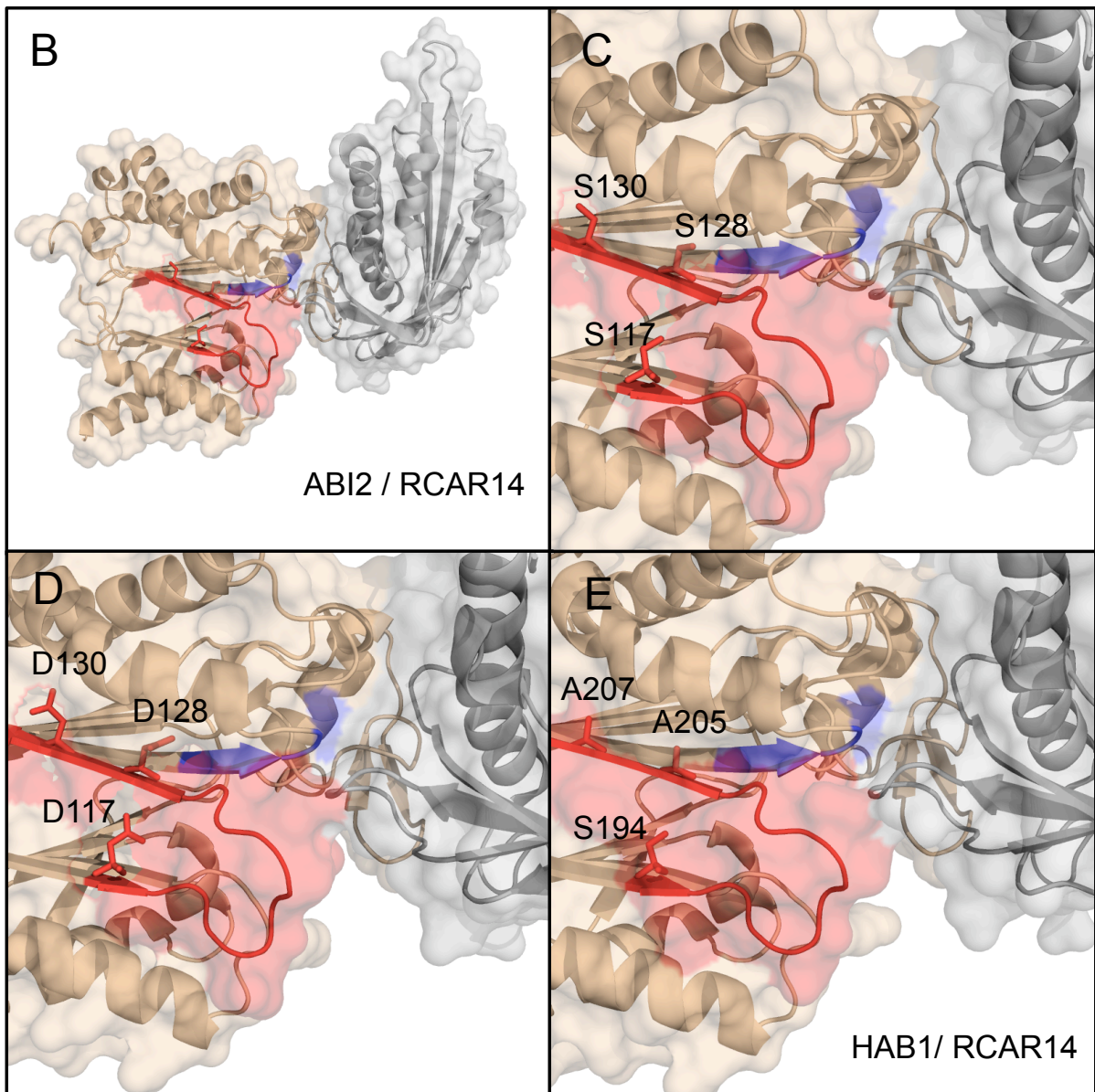


Abb. 4.6 Sequenzalignment der PP2C Phosphatasen und Kristallstruktur von ABI2 bzw. HAB1 mit RCAR14

A) Darstellung der Interaktionsdomänen der Proteinphosphatasen mit den RCAR Proteinen (RCAR a-c) sowie des katalytischen Zentrums (CD). Phosphorylierte Aminosäuren wurden rot dargestellt. Die genauen Phosphorylierungsdaten befinden sich im Anhang. Konservierte Aminosäuren aller Proteinphosphatasen wurden schwarz hinterlegt, konservierte Aminosäuren der *ABI1-like* Proteinphosphatasen wurden gelb markiert sowie konservierte Aminosäuren der HAI ähnlichen PP2Cs grün. Das in der ABA-Bindung involvierte konservierte Tryptophan (W) wurde pink hervorgehoben. B) Kristallstruktur des Proteinkomplexes aus ABI2 (gold) und RCAR14 (grau) (pdb: 3UJL). Die ABI2 Interaktionsfläche mit RCAR(a) inklusive der darauffolgenden vier Aminosäuren wurde rot markiert sowie die benachbarte katalytische Domäne blau. Phosphorylierungsstellen in diesem Bereich wurden als *sticks* dargestellt. C) Vergrößerung des RCAR(a) Interaktionsbereiches mit den Aminosäuren Serin¹¹⁷, Serin¹²⁸ und Serin¹³⁰. In D) wurden diese Aminosäuren zu Aspartat mutiert, um eine mögliche Phosphorylierung zu simulieren. In E) ist derselbe Ausschnitt zu sehen, jedoch mit der Proteinphosphatase HAB1 und RCAR14 (pdb: 3KB3), welche anstelle der Serine^{128/130} zwei Alanine^{205/207} besitzt. Die Strukturen wurden mittels MacPyMOL erstellt.

Durch massenspektrometrische Analyse wurden Phosphorylierungsstellen in allen untersuchten PP2Cs ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 detektiert. Betrachtet man die Lokalisation dieser Phosphorylierungsstellen, treten phosphorylierte Aminosäuren gehäuft im Anschluss an die RCAR Bindestellen auf, welche womöglich dadurch beeinflusst werden könnten (Abb. 4.6 A). Zum Beispiel befindet sich in ABI1 ein „DAVST“ Motiv direkt nachfolgend zur RCAR(a) Bindestelle sowie ein „SRSI“ Motiv nachfolgend der RCAR(c) Interaktionssequenz. Beide Sequenzmotive variieren innerhalb der untersuchten PP2Cs und könnten somit zu Substratspezifität beitragen. Während ABI1 ein „DAVST“ aufweist, hat ABI2 die Sequenz „DSVST“, HAB1 „DAFAV“ und PP2CA „DAVSI“. Damit trägt ABI2 spezifisch eine Phosphorylierung an allen Serinen dieser Sequenz im Gegensatz zu HAB1, welches sequenzabhängig keine Phosphorylierung aufweisen kann. Betrachtet man diese Phosphorylierungsstellen in der abgebildeten Kristallstruktur von ABI2 und HAB1 im Komplex mit RCAR14, scheint ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierung dieser Aminosäuren und einer RCAR-PP2C Interaktion möglich (Abb. 4.6 B). In den Vergrößerung Abb. 4.6 C) bis E) wird die Situation der ABI2 Serine bzw. der möglichen Phosphorylierungsmimikry Aspartat-Mutanten aufgezeigt. Mit der Phosphorylierung verändert sich sowohl die Größe der Aminosäure als auch deren Ladung, was einen Effekt auf die RCAR(a) Bindestelle und eventuell die strukturell nahe liegende katalytische Domäne haben kann. In HAB1 ist diese Einflussnahme durch die Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion nicht möglich, da diese Positionen durch Alanine besetzt sind. Eine ähnliche Sequenzfolge, für die jedoch keine Phosphorylierung detektiert werden konnte, befindet sich im Anschluss an die RCAR(b) Interaktionssequenz. Für ABI1 und ABI2 lautet diese Sequenz „STSVVA“ für HAB1 „STAVVA“ sowie für PP2CA „STAVVS“, wodurch wiederum jede Phosphatase individuell phosphoryliert werden könnte. Genauere Untersuchungen der Interaktion zwischen Proteinphosphatasen und RCAR Proteinen unter Einfluss der Proteinkinasen des ABA-Signalwegs sollten anhand dieser Ergebnisse durchgeführt werden.

Zur Untersuchung der *in vivo* Interaktion zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen des ABA-Signalwegs wurden die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 in Protoplasten mit PP2CA kotransfiziert. Obwohl PP2CA ein starker negativer Regulator der ABA-Antwort ist, wurden dennoch Unterschiede in der Repressionsstärke der ABA-Antwort zwischen den einzeln koexprimierten CPK Proteinkinasen festgestellt (Abb. 3.30 B). Aufgrund dieser beobachteten Abweichungen wurde die Aktivität der Phosphatase in Anwesenheit der jeweiligen Proteinkinase in einem Phosphatase-Aktivitätstest untersucht. Es konnte eine klare Steigerung der Phosphataseaktivität durch Titration der Proteinkinase CPK23L und CPK21 detektiert werden, während CPK23C und OST1 die Aktivität nicht beeinflussten (Abb. 3.31; Abb. 4.7 B). Eine ähnliche Aktivierung der Phosphataseaktivität konnte für ABI2 und CPK12 in Zhao *et al.* (2011) nachgewiesen werden (Abb. 4.7 A). In jener Studie wurde untersucht ob CPK12 ebenso wie seine Homologe CPK11 und CPK4 als positiver Regulator der ABA-Antwort fungiert. Jedoch wurde für die CPK12 RNAi Linie eine ABA-Hypersensitivität detektiert und dadurch eine negative Regulation der ABA-Antwort. In weiteren Untersuchungen wurde ABF1, ABF4 und ABI2 als endogenes Substrat dieser Proteinkinase bestimmt und ihr Einfluss auf die ABI2 Aktivität untersucht.

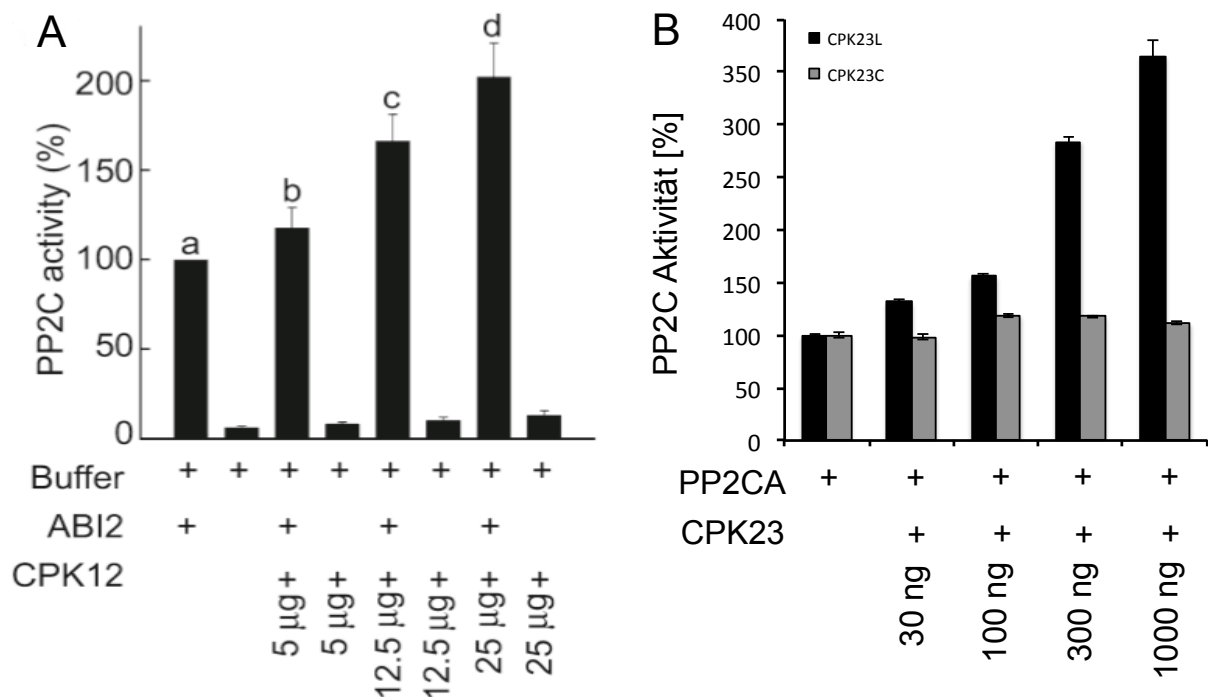


Abb. 4.7 Phosphataseaktivität von ABI2 und PP2CA in Abhängigkeit von CPK12 bzw. CPK23

A) Dargestellt ist die gemessene ABI2 Phosphataseaktivität in % gegen eine steigende Menge an CPK12 Protein. In den Versuch wurden 10 µg ABI2 Phosphatase eingesetzt. Bei einem Verhältnis von etwa 1 : 2 von Phosphatase zu Proteinkinase wurde eine 2-fach erhöhte Phosphataseaktivität detektiert (entnommen aus Zhao, R., Wang, X.F. und Zhang, D.P. (2011). CPK12: A Ca²⁺-dependent protein Proteinkinase balancer in abscisic acid signaling. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1687-1690. Abgedruckt mit der Erlaubnis von John Wiley and Sons). B) Zum Vergleich ein Balkendiagramm der in Abb. 3.31 gezeigten Daten von CPK23L und CPK23C.

Durch Zugabe von 25 µg CPK12 wurde eine Steigerung der ABI2 Aktivität auf 200% erreicht. Eine vergleichbare Erhöhung der Aktivität wurde ebenfalls für PP2CA und CPK23L bzw. CPK21 detektiert (Abb. 3.31; Abb. 4.7 B). Um diesen Effekt zu bewirken, war in beiden Experimenten ein 1 : 2 Verhältnis von PP2C zu Proteinkinase ausreichend. Diese Ergebnisse verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Phosphataseaktivität und der negativen Regulation von CPKs. Da eine Steigerung der Phosphataseaktivität, sowohl mit als auch ohne ATP, erfolgte bzw. auch die Verwendung einer inaktiven Proteinkinase zu einer Erhöhung der Aktivität führte (Abb. 3.31), wird davon ausgegangen, dass allein die direkte Interaktion beider Proteine essentiell aber auch ausreichend für diesen Effekt ist. Die Feststellung, dass CPK23 ein negativer Regulator ist, wird auch durch physiologische Untersuchungen gestützt. Die Analyse einer T-DNA *knockout* Linie zeigte zwar keinen deutlichen ABA-abhängigen Phänotypen, war jedoch im Keimungsverhalten leicht ABA-hypersensitiv, wie es für einen negativen Regulator zu erwarten ist (Czap, 2015). So wurden *knockout* Linien der PP2C Proteinphosphatasen als auch der CPK21 Proteinkinase als ABA-hypersensitive Mutanten identifiziert (Rubio *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2011), während *knockout* Linien der positiven Regulatoren CPK4 und CPK11 zu einem ABA-insensitiven Keimungsverhalten führten (Zhu *et al.*, 2007). Was erklärt nun aber den Unterschied zwischen den CPK23 Proteinen aus den Ökotypen Landsberg und Columbia? Beide Proteine weisen untereinander eine hohe Sequenzidentität auf sowie auch zu CPK21. Da die Proteinkinaseaktivität nicht für eine zusätzliche Aktivierung der Phosphatase benötigt wurde, muss der Unterschied in der Sequenz und damit möglicherweise in der Proteinstruktur von CPK23L und CPK23C liegen.

4.3 Unterschiede zwischen CPK23L und CPK23C

Eine noch offene Frage ist der Ökotyp-spezifische Unterschied zwischen CPK23L und CPK23C. Während CPK23 aus *Landsberg erecta* eine klare negative Regulation der Transkriptionsfaktoren im transienten Expressionssystem bewirkte, verhielt sich CPK23 aus Columbia ambivalent. Generell kann zwischen den verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen eine hohe natürliche Varianz festgestellt werden (Clark *et al.*, 2007). Aufgrund von abiotischen Stressfaktoren kommt es zu einer Erhöhung der Rekombinationsrate, Mutationsrate und Selektion auf einen bestimmten Gen-Locus (Koornneef *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2009). In einer Untersuchung von 10 verschiedenen *Arabidopsis* Ökotypen in Bezug auf Hitzestress wurden rund 85% der Transkripte in jedem Ökotyp unterschiedlich reguliert (Barah *et al.*, 2013). Darunter befand sich auch eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, inklusive ABF3, welche Ökotyp-spezifische Expressionsmuster aufzeigten, die zu einer divergenten Thermotoleranz führten. In Meyre *et al.* (2001) wurden gesondert die Unterschiede der Ökotypen Landsberg und Columbia untersucht. Während Landsberg Pflanzen unter Trockenstress zu einer

Fluchtstrategie mit verfrühter Blütezeit und Blattseneszenz neigten, versuchten Columbia Pflanzen durch Veränderung des Wurzel-zu-Spross Verhältnisses und effizienter Wassernutzung auf die Trockenheit zu reagieren (Meyre *et al.*, 2001). Die F₂ Population einer Kreuzung dieser Ökotypen wurde in Korte (2009) genauer analysiert. Keimlinge dieser Population spalteten sich in einen ABA-sensitiven, Landsberg-ähnlichen Phänotyp, einen ABA-insensitiven, Columbia-ähnlichen Phänotyp und einen intermediären Phänotyp auf. Dabei wurde eine deutliche Korrelation zwischen dem CPK23 Locus sowie der ABA-Sensitivität der F₂ Population festgestellt.

Die Unterschiede in der Primärsequenz zwischen den Proteinen CPK23L und CPK23C belaufen sich in der Aminosäuresequenz auf 10,4 %. Ein Alignment der CPK Proteine CPK23L, CPK23C sowie CPK21 ist in Abbildung 3.8 dargestellt, wobei deutlich wird, dass die größten Sequenzunterschiede im N-Terminus der Proteine zu finden sind. Der N-terminale Bereich der CPK Familie weist die höchste Variabilität auf und ist sowohl für die Lokalisation als auch die Protein-Protein Interaktion ausschlaggebend (Ito *et al.*, 2010). In Ito *et al.* (2011) wurde nachgewiesen, dass ein chimäres Protein, bestehend aus dem N-Terminus der NtCDPK1 und der Proteinkinase Domäne aus AtCDPK9, den RSG (*repression of shoot growth*) Transkriptionsfaktor aus Tabak phosphorylieren konnte. Durch Übertragung des N-Terminus aus Tabak auf die AtCDPK9 Proteinkinase wurde es dieser ermöglicht den Transkriptionsfaktor als endogenes Substrat zu erkennen. Auf ähnliche Weise wurden die Proteinkinasen CPK23L und CPK23C in Czap (2015) untersucht. Es wurde eine CPK23L Chimäre hergestellt, deren N-Terminus durch die ersten 63 Aminosäuren des Ökotyps Columbia ersetzt wurde und *vice versa*. Beide chimären Konstrukte wurden in Protoplasten transfiziert und mit den Wildtyp CPK23L sowie CPK23C verglichen. Obwohl die N-terminalen Regionen getauscht wurden, wiesen beide Chimären die entsprechende Aktivität zum Wildtyp auf. Durch den Tausch der N-Termini der CPK23 Ökotypen Landsberg und Columbia konnte nicht der Unterschied in der Regulation des ABA-Signalwegs erklärt werden. Jedoch konnte ein Unterschied in der Untersuchung N-terminal verkürzten CPK23L und CPK23C Versionen im transienten Expressionssystem beobachtet werden (Abb. 3.34). Hier führte eine Deletion der N-terminalen 14 Aminosäuren von CPK23L zu einer Aufhebung der Inhibierung der ABA-Antwort, während die N-terminalen Verkürzungen von CPK23C keinen Effekt auf die ABA-Induktion hatten. Dieser Einfluss lässt sich jedoch nicht durch eine von der Deletion herrührenden Aktivitätsverlust erklären, da die N-terminalen Verkürzungen vorher *in vitro* auf ihre Aktivität getestet wurden und sich kein Unterschied in der Aktivität erkennen ließ (Abb. 3.33).

Eine *in vitro* Untersuchung von chimären Konstrukten von CPK23L und CPK23C auf Proteinebene wurde nicht durchgeführt, wäre aber durchaus interessant. Denn *in vitro* wurden gravierende Unterschiede zwischen dem Verhalten von CPK23L und CPK23C festgestellt, die sich eventuell durch Chimären aufklären ließen. So wurde eine Phosphorylierung der PP2CA Phosphatase in Abbildung 3.26 durch die Proteinkinasen CPK23L sowie CPK21 festgestellt, während in Verwendung von CPK23C und auch OST1 PP2CA nicht phosphoryliert detektiert wurde. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung der in Abbildung 3.31 untersuchten Phosphataseaktivität. Während CPK23L und CPK21 eine Steigerung bewirkten, blieb die Titration mit CPK23C und OST1 ohne Effekt. Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass eine Interaktion zwischen CPK23C und PP2CA nicht zustande kam. Dies bildet jedoch eine Kontroverse zu Interaktionsdaten aus einem *yeast2hybrid*, veröffentlicht in Fuchs (2013). In jener Analyse wurde keine Interaktion zwischen PP2CA und CPK21, jedoch eine Interaktion zwischen PP2CA und einer verkürzten Version von CPK23L, gefunden. Für diese Bindung war sowohl die Deletion der Calmodulin-ähnlichen Domäne des CPK23L Proteins als auch die aktive Form der Proteinkinase essentiell (Fuchs, 2013). Bei einer Weiterführung jener Analyse wurde diese Intaktion auch für die verkürzte Version von CPK23C bestätigt. Jedoch unterscheiden sich beide Ökotypen in der Bindung mit PP2CA in den volle Länge Proteinen. Während CPK23L keine Interaktion mit PP2CA eingeht, wurde für CPK23C eine Interaktion im Y2H gefunden (Kornbauer, unveröffentlicht). Möglicherweise zeigt dieser Versuch einerseits die Spezifizierung zwischen verkürzten- und volle Länge Versionen der Proteinkinasen, andererseits aber auch die Limitierung dieser Methode durch falsch negative Ergebnisse. Obwohl eine Phosphorylierung der PP2CA Phosphatase durch CPK21 sowohl im radioaktiven Proteinkinase-Aktivitätstest nachgewiesen wurde als auch die Phosphorylierungsstellen massenspektrometrisch bestätigt wurden, konnte keine Interaktion im Y2H festgestellt werden (Fuchs, 2013). Falsch negative Interaktionen sind in der Y2H Methode keine Seltenheit, da aufgrund von eventueller Membranständigkeit der Proteine oder posttranslationalen Modifikationen manche Bindungen nicht bestimmt werden können (Brückner *et al.*, 2009). Auch sehr schnelle und transient ablaufende Interaktionen können oft nicht detektiert werden. Auffällig ist, dass im Y2H die Interaktion von CPK23L und CPK21 mit PP2CA nicht detektiert wurden, während CPK23C und auch OST1 eine Interaktion zeigten (Fuchs, 2013; Lee *et al.*, 2009), was Vermutungen über die Art der Interaktion aufkommen lässt. Während CPK23L und CPK21 möglicherweise nur transient mit PP2CA interagieren, könnte es mit CPK23C und OST1 zu einer langsameren, aber stabileren Bindung zwischen den Interaktionspartnern kommen. Dies stellt eine potentielle Erklärung für die in Abb. 3.26 detektierten Unterschiede in der Phosphorylierung der PP2CA Phosphatase durch die Proteinkinasen dar.

Eine weitere Entdeckung, die womöglich den Unterschied zwischen Landsberg und Columbia CPK23 aufzeigt, wurde in der Analyse der intermolekularen Phosphorylierungsstellen deutlich (Abb. 3.11). Während die Landsberg CPK23 Proteinkinase von allen untersuchten Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 intermolekular phosphoryliert werden konnte, wurde CPK23C nur durch sich selbst phosphoryliert. Ob dies an der Probenvorbereitung oder dem nicht Zustandekommen der Interaktion lag, müsste durch eine Wiederholung der massenspektrometrischen Analyse genauer untersucht werden. Durch die Analyse der intermolekularen Phosphorylierung der Proteinkinasen des ABA-Signalwegs untereinander wurde eine Vielzahl an Phosphorylierungsstellen entdeckt (Abbildung 3.11). Besonderer Fokus lag dabei auf den intermolekularen Phosphorylierungen zwischen OST1 und CPK23. Auch hier zeigten sich wieder Unterschiede zwischen den Ökotypen Landsberg und Columbia. Während für CPK23C keine OST1 spezifische Phosphorylierung detektiert werden konnten, wurden in CPK23L drei Phosphorylierungsstellen detektiert, Threonin²⁷, Threonin³¹⁷ sowie Serin³³⁹, die weder durch Autophosphorylierung noch durch die Proteinkinasen CPK23C und CPK21 modifiziert wurden. CPK23L Threonin²⁷ liegt im N-terminalen Bereich der Proteinkinase und könnte dadurch Einfluss auf Substratbindung und Lokalisation nehmen. Dieses Threonin ist eine konservierte Aminosäure der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und CPK21 und wurde als Autophosphorylierungsstelle von CPK21 identifiziert. Ebenso verhält es sich mit dem gefundenen CPK23L Threonin³¹⁷. Auch diese Aminosäure wurde in CPK21 bereits selbst phosphoryliert, jedoch nicht in den Proteinkinasen CPK23L und CPK23C. Anders verhält es sich zu der intermolekular gefundenen Phosphorylierungsstelle CPK23L Serin³³⁹. Diese liegt weder in CPK23L noch in CPK21 phosphoryliert vor, kann aber durch CPK23C autophosphoryliert werden. Obwohl diese Phosphorylierungsstellen nicht im aktiven Zentrum der Proteinkinasen liegen, könnten diese Aminosäuren möglicherweise helfen, den Regulationsmechanismus zwischen der CPK23L Proteinkinase und OST1 zu entschlüsseln. Vorherige Studien hatten bereits den Regulationsmechanismus zwischen OST1 und CPK23L untersucht und neben den intermolekularen Phosphorylierungsstellen CPK23L Threonin³¹⁷ und Serin³³⁹ noch ein weiteres Threonin²¹³ festgestellt (Wellmann, 2012). Während Mutationen an CPK23L Threonin³¹⁷ keine Auswirkungen auf die Aktivität der Proteinkinase nahmen, führte eine Alanin-Substitution an CPK23L Threonin²¹³ zu einer Inaktivierung der Proteinkinaseaktivität. Der Einfluss der Phosphorylierungsstelle CPK23L Serin³³⁹ wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Allerdings wurde eine negative Regulation der OST1 Aktivität durch CPK23L postuliert (Wellmann, 2012). In OST1 wurde auch eine intermolekulare Phosphorylierungsstelle durch CPK23L und CPK23C an OST1 Serin¹⁵² detektiert, welche im aktiven Zentrum zwischen *catalytic loop* und *activation loop* der Proteinkinase liegt und möglicherweise die Aktivität von OST1 regulieren kann (Abb. 3.11). Um die Auswirkungen von Phosphorylierungsstellen im aktiven Zentrum der Proteinkinasen genauer abzuschätzen sind diese in Abbildung 4.8 illustriert.

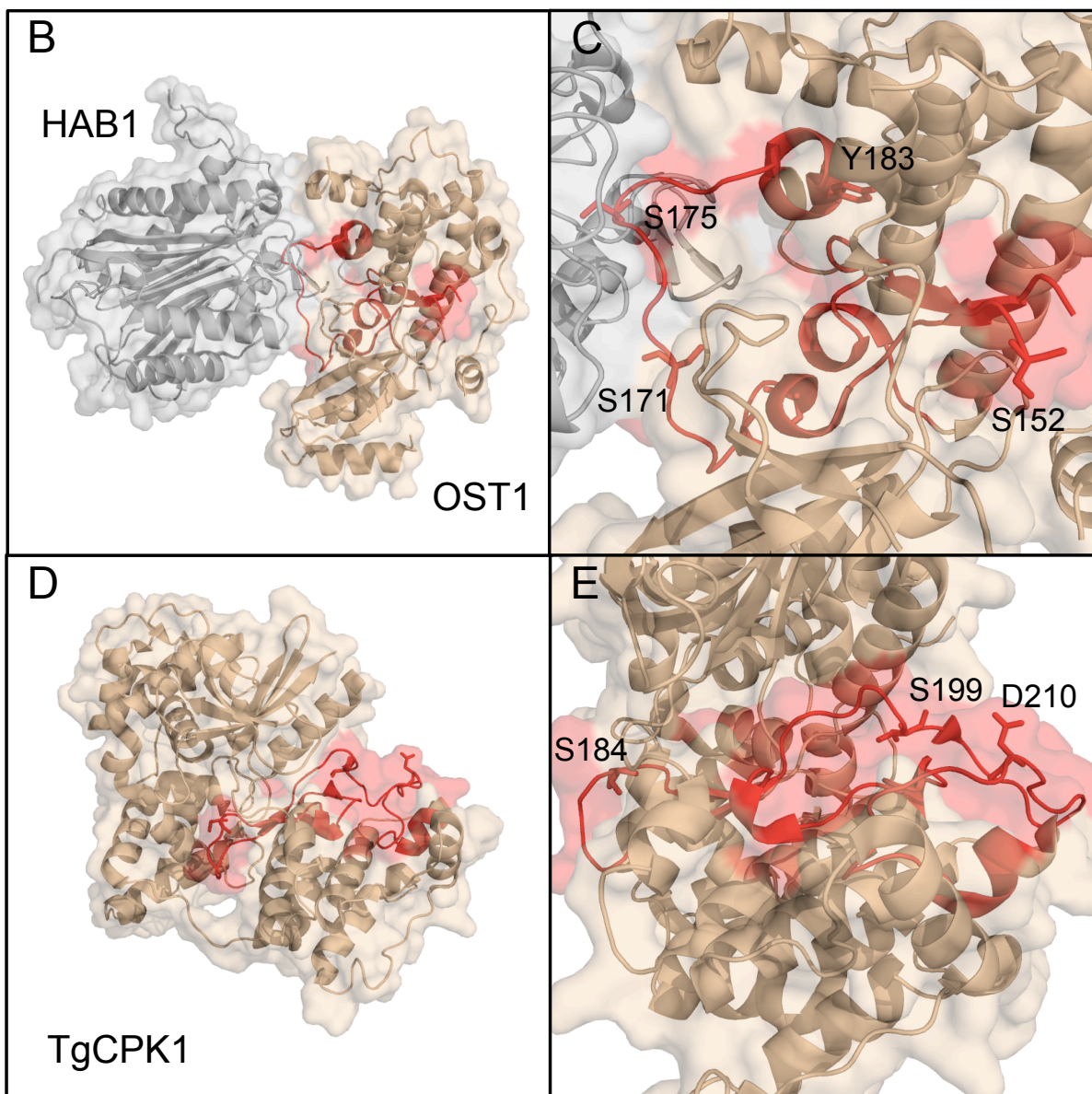
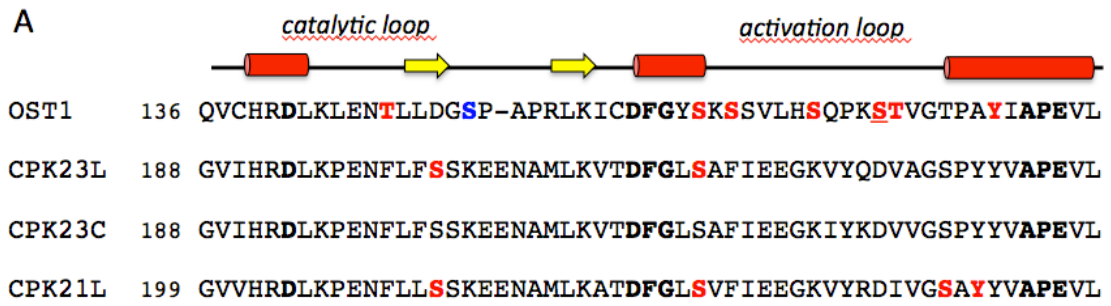


Abb. 4.8 Sequenzalignment des aktiven Zentrums und Kristallstruktur der Proteinkinasen OST1 und TgCPK1

A) Das aktive Zentrum der Proteinkinasen OST1, CPK23L, CPK23C und CPK21 ist anhand eines Alignments der Primärsequenz dargestellt. Darüber befindet sich eine schematische Darstellung der Sekundärstruktur der OST1 Proteinkinase, veröffentlicht in Soon *et al.*, 2012 (pdb: 3UJG). Autophosphorylierungsstellen sind rot gekennzeichnet. Die genauen Phosphorylierungsdaten befinden sich im Anhang. Das durch CPK23L und CPK23C intermolekular phosphorylierte OST1 Serin¹⁵² wurde blau markiert. Essentielle konservierte Aminosäuren wurden fett hervorgehoben. B) Kristallstruktur des Proteinkomplexes aus HAB1 (grau) und OST1 (gold) (pdb: 3UJG). Die in A) abgebildete Sequenz wurde in der Kristallstruktur rot hervorgehoben. Abbildung C) zeigt eine Vergrößerung von B) in der die phosphorylierten Aminosäuren Serin¹⁵², Serin¹⁷¹, Serin¹⁷⁵ sowie Tyrosin¹⁸³ als *sticks* dargestellt sind. D) zeigt die Kristallstruktur der Calcium gebundenen CPK1 aus *Toxoplasma gondii* (pdb: 3HX4), in der das aktive Zentrum rot markiert wurde. In E) ist eine Vergrößerung dieses Bereichs abgebildet. Die Aminosäuren Serin¹⁸⁴, Serin¹⁹⁹ und Aspartat²¹⁰, welche in CPK23L den phosphorylierten Aminosäuren Serin²⁰², Serin²¹⁸ und Aspartat²²⁹ entsprechen, sind als *sticks* dargestellt. Die Strukturen wurden mittels MacPyMOL erstellt.

Neben intermolekularen Phosphorylierungsstellen ist ein Großteil der Proteinkinasen in der Lage sich selbst, oft Calcium- oder Magnesium-abhängig, zu phosphorylieren (Roberts und Harmon, 1992). In Hegeman *et al.* (2006) wurde die Autophosphorylierung von Proteinkinasen, darunter auch sieben CPKs aus Arabidopsis, untersucht und massenspektrometrisch analysiert. Es wurden fünf konservierte Autophosphorylierungsstellen im N-Terminus, der Calmodulin-ähnlichen Domäne sowie auch in der Proteinkinasedomäne identifiziert. Phosphorylierungsstellen im Bereich des aktiven Zentrums sind dabei von essentieller Bedeutung. So bewirkt die elektrostatische Interaktion zwischen phosphorylierten Aminosäuren im *activation loop* des aktiven Zentrums eine Konformationsänderung, welche die Aktivität der Proteinkinase reguliert (Nolen *et al.*, 2004). Eine solche Regulation konnte in OST1 durch die Phosphorylierung von OST1 Serin¹⁷⁵ beobachtet werden. Dieses Serin kann wiederum durch PP2C Proteinphosphatasen dephosphoryliert werden, was zur Inaktivierung der Proteinkinase führt (Ng *et al.*, 2011). Dies wird auch durch die Betrachtung der in Abb. 4.8 gezeigten Kristallstruktur deutlich. Sowohl OST1 Serin¹⁷¹ als auch Serin¹⁷⁵ liegen an der Interaktionsfläche mit der Proteinphosphatase HAB1 und können dadurch sowohl für die Substratinteraktion als auch für die katalytische Aktivität von Relevanz sein. Ein Effekt der Aminosäuren Tyrosin¹⁸³ auf die katalytische Aktivität von OST1 konnte bereits gezeigt werden (Abb. 3.10 A). Inwieweit das durch CPKs intermolekular phosphorylierte OST1 Serin¹⁵² die Aktivität beeinflusst, gilt es noch zu untersuchen. Die in der Kristallstruktur von TgCPK1 rot hervorgehobenen Aminosäuren stellen zum einen die Autophosphorylierungsstellen im aktiven Zentrum von CPK23L und CPK21 dar, zum anderen ist das unter den CPKs konservierte Aspartat²¹⁰ (CPK23L Aspartat²²⁹) herausgestellt. Diese Aminosäure befindet sich an der konservierten Position des Serins¹⁷⁵ und könnte eine molekulare Mimikry eines phosphorylierten Serins sein. Möglicherweise ist diese Aminosäure der Grund dafür, dass die in Abbildung 3.26 untersuchten CPKs eine deutliche Autophosphorylierung in Anwesenheit der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1

zeigten, während OST1 nicht in der Lage war, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von ABA, sich selbst zu phosphorylieren bzw. stets dephosphoryliert wurde. Diese Annahme wird auch in weiteren Studien bestätigt, indem CPK11 bzw. CPK6 in Anwesenheit von Phosphatasen phosphoryliert detektiert wurden, während OST vollständig dephosphoryliert wurde (Lynch *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2015). Diese Beobachtungen stimmen nicht mit dem bisher postulierten Modell der ABA-Signaltransduktion überein.

4.4 Abschließendes hypothetisches Modell der ABA-Signaltransduktion

Das gängige Modell stellt die Proteinphosphatasen als negative Regulatoren des ABA-Signalwegs an die Spitze der Signalkaskade. Die Aktivierung und Deaktivierung dieser Proteinphosphatasen erfolgt über die ABA-induzierte Komplexbildung mit den RCAR ABA-Rezeptoren (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Findet eine Komplexbildung statt, wird die negative Regulation des Signalwegs durch die Inaktivierung der Proteinphosphatasen aufgehoben (Raghavendra *et al.*, 2010). Die vorher an die Phosphatase gebundene SnRK2 Proteinkinase OST1 wird freigesetzt und beginnt endogene Substrate, wie Ionenkanäle und ABF Transkriptionsfaktoren, zu phosphorylieren (Yoshida *et al.*, 2015). Durch die Phosphorylierung wird sowohl der Stomataschluss als auch die ABA-abhängige Genexpression gesteuert, wodurch eine physiologische Anpassung der Pflanze an Trockenstress erfolgt (Boudsocq und Sheen, 2013; Schulz *et al.*, 2013; Geiger *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2015). Jedoch sind nicht nur Pflanzen umweltabhängigen Stressfaktoren ausgesetzt, auch Bakterien, Hefen und sogar der Mensch müssen sich permanent an Stresssituationen anpassen und besitzen eine dementsprechende Signalkaskade (Abb. 4.9; Fuchs *et al.*, 2012).

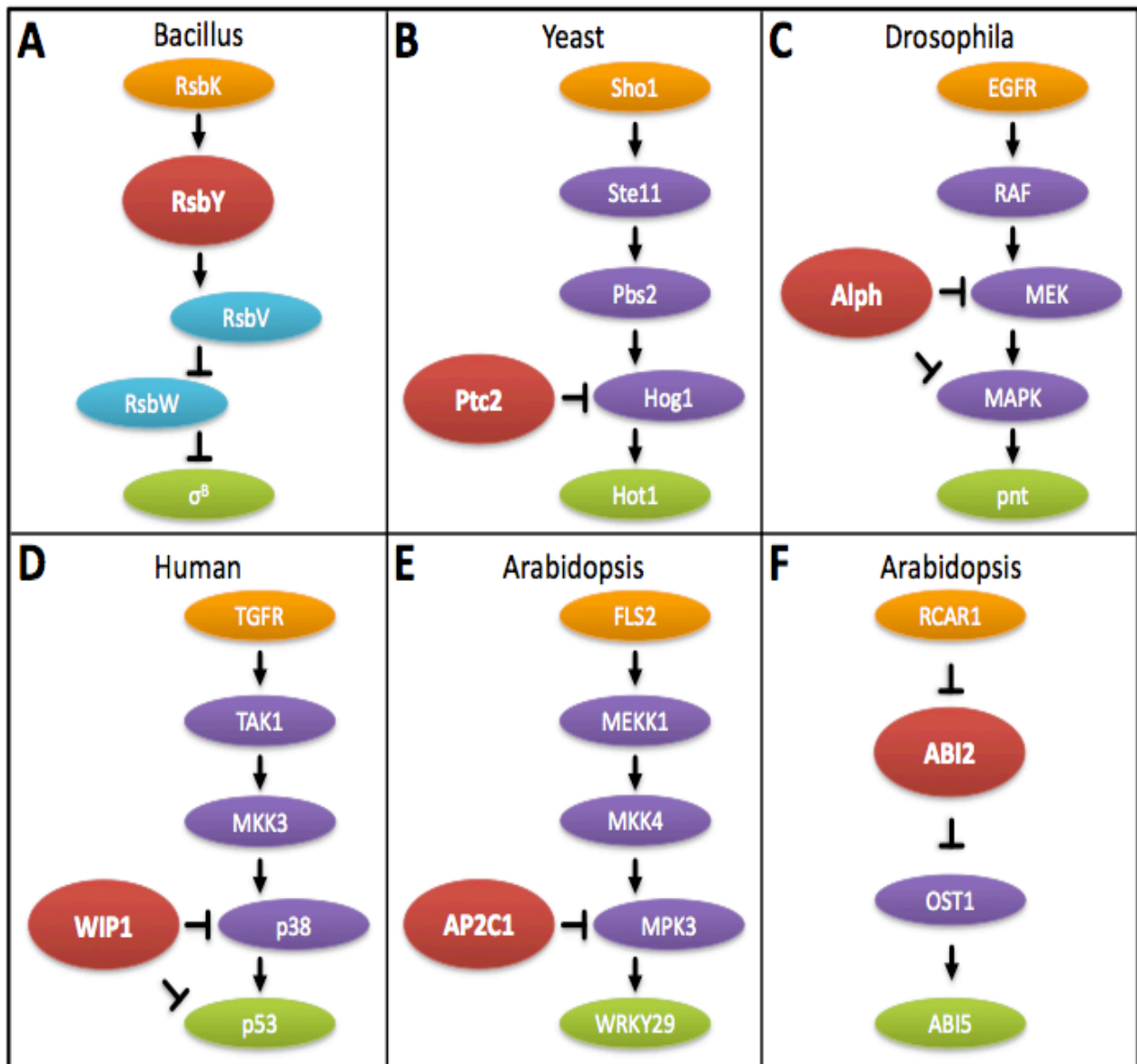


Abb. 4.9 Vergleichende Darstellung der stressinduzierten Signalwege

Abbildung der stressinduzierten Signalwege aus *Bacillus* (A), Hefe (B), *Drosophila* (C), Mensch (D) und *Arabidopsis* (E, F). Sensor Proteine wurden orange dargestellt. Diese beeinflussen die Aktivität von Proteinkinasen (violett) und Proteinkomplexen (türkis), welche wiederum durch Proteinkomplexen (rot) reguliert werden (Blockierungssymbol). Die Weiterleitung des Stresssignals (schwarze Pfeile) führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (grün), welche dadurch eine stressabhängige Genexpression induzieren, wodurch es zu physiologischen Anpassungen kommt (entnommen aus Fuchs, 2013).

Im Bakterium *Bacillus cereus* verhält sich die Stressantwort auf Energie- und Nährstoffmangel ähnlich der Arabidopsis Signaltransduktion unter Trockenstress. In *Bacillus* wird das Stresssignal über eine Multi-Sensor Hybrid-Proteinkinase RsbK wahrgenommen, welche dadurch aktiviert wird und daraufhin eine PP2C Serin Phosphatase RsbY phosphoryliert (Desriac *et al.*, 2013). Das endogene Substrat dieser Phosphatase ist RsbV, welches dephosphoryliert einen Komplex mit RsbW eingeht. Durch die Komplexbildung RsbVW wird der durch RsbW gebundene Transkriptionsfaktor σ^B freigesetzt, wodurch es zu einer stressadaptierten Genexpression kommt. Kontrolliert wird dieser Mechanismus durch RsbM, welches die Sensor-Proteinkinase RsbK durch Methylierung am Glutamat⁴³⁹ inhibieren kann (Desriac *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2012). Eine Trennung der Sensorfunktion von der Proteinkinaseaktivität erfolgt im osmotischen Stress-Signalweg in Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Young *et al.*, 2002). In einer hyperosmotischen Umgebung wird eine MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Signalkaskade ausgelöst, die zum Wasserverlust der Zelle innerhalb von Minuten führt. Die Wahrnehmung der Osmolarität erfolgt über den Sensor Sho1 (*sensor for high osmolarity 1*), welcher die Aktivierung der MAPKKK Ste11 (*sterile 11*) einleitet. Das Phosphorylierungssignal wird über die MAPKK Pbs2 (*polymyxin B sensitivity 2*) und die MAPK Hog1 (*high osmolarity glycerol 1*) auf den Transkriptionsfaktor Hot1 (*high osmolarity-induced transcription 1*) übertragen. Dabei greift die Phosphatase Ptc2 (*phosphatase two C 2*) auf der Ebene der Hog1 Phosphorylierung und Pbs2 Phosphorylierung in den Signalweg ein, indem diese Proteinkinasen dephosphoryliert und dadurch inaktiviert werden (Gonzalez *et al.*, 2006; Miermont *et al.*, 2011). In ähnlicher Weise greift die Phosphatase Alph (*alphabet*) in die MAPK Signalkaskade der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ein, welche in die Entwicklung des Auges involviert ist (Baril und Therrien, 2006). In Fruchtfliege erfolgt die Signalerkennung über den Rezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*), welcher im Anschluss eine MAPKKK RAF (*recombinase activating factor*) aktiviert. Daraufhin wird das Signal über eine MAPKK (MEK) und MAPK an den Transkriptionsfaktor pnt (*pointed*) weitergeleitet. Wie auch in Hefe kontrolliert die im Regulationsweg beteiligte Phosphatase Alph die Ebene der MAPKK und MAPK, wodurch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors inhibiert werden kann (Freeman, 1996; Gaengel und Mlodzik, 2003; Baril und Therrien, 2006). Im Menschen wird die MAPK Signalkaskade durch die Phosphatase eine Ebene tiefer, auf Level der MAPK und des Transkriptionsfaktors, reguliert. Ein stressinduziertes Signal wird in der menschlichen Zelle durch TGFR (*transforming growth factor receptor*) wahrgenommen. Durch die Phosphorylierungskaskade über MAPKKK TAK1 (*TGF β activated Proteinkinase 1*) sowie MKK3 (*MAPKK 3*) kommt es zu einer Aktivierung der p38 MAPK (Cuadrado und Nebreda, 2010). Diese kann den Transkriptionsfaktor p53 phosphorylieren und dadurch aktivieren, welcher ein essentieller Transkriptionsfaktor der Tumorunterdrückung und Apoptose ist. Sowohl zu einer direkten Dephosphorylierung und Inaktivierung dieses Transkriptionsfaktors als auch der MAPK p38 kommt es durch die Phosphatase

WIP1 (*wild-type p53-induced phosphatase 1*). Durch diese Fähigkeit wird die Phosphatase WIP1 als Onkogen bestätigt, da eine Überexpression dieses Proteins das Tumorstadium beschleunigt, während ein Gen-*knockout* verringerte Tumorbildung in Mäusen zur Folge hat (Lu *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2011; Goloudina *et al.*, 2012). Zurück in Pflanze gibt es neben den abiotischen Stressfaktoren, welche meist zur ABA-Induktion führen, auch biotische Stressfaktoren wie Herbivore und Pathogene (Fujita *et al.*, 2006; Chakraborty und Newton, 2011). Tritt ein Befall der Pflanze durch einen bakteriellen Krankheitserreger auf, wird eine Flagellin-induzierte Signalkaskade ausgelöst. Dazu wird das bakterielle Flagellin durch FLS2 (*Flagellin sensitiv 2*) wahrgenommen und in ein Phosphorylierungssignal übersetzt, indem die MAPKKK MEKK1 aktiviert wird. Diese aktive Proteinkinase führt zur Phosphorylierung von MAPKK MKK4, welche wiederum MAPK MPK3 phosphoryliert. Durch Übertragung des Phosphorylierungssignal auf MPK3 kann diese Proteinkinase den Transkriptionsfaktor WRKY29 aktivieren, wodurch es zu einer physiologischen Stressantwort kommt (Asai *et al.*, 2002; Chinchilla *et al.*, 2007; Qui *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010).

In der Analyse der einzelnen stressinduzierten Signalwege von Bacillus, Hefe, Drosophila und Mensch wurde eine Tatsache sehr deutlich: Alle Signalwege unterliegen einer Rezeptorkomponente, die das Signal perzipieren kann und einer Proteinkinase, die den Stress in ein Phosphorylierungssignal übersetzt. In Bacillus werden diese beiden Funktionen sogar durch nur ein Protein ausgeführt, einer Multi-Sensor Hybrid-Proteinkinase RsbK (Chen *et al.*, 2012; Desriac *et al.*, 2013). Selbst der in Arabidopsis genau analysierte Flagellin-Signalweg unter biotischen Stressbedingungen wird über eine Signalkomponente und eine darauffolgende Proteinkinase aktiviert (Asai *et al.*, 2002). Die negative Regulation durch Proteinphosphatasen erfolgt in allen Signalkaskaden erst auf der darunterliegenden Ebene. Außer in der ABA-Signaltransduktion in Arabidopsis und durch Rezeptorprotein Tyrosin Phosphatasen (RPTP) in Mensch und Tier (Alonso *et al.*, 2004; Senis, 2013). In diesen Signalkaskaden findet die negative Regulation durch die Phosphatase parallel zur Rezeptoraktivierung statt. In Arabidopsis sind alle in der ABA-Signalkaskade agierenden Proteinkinasen von dieser Regulation abhängig. Doch in welchem Umfang stimmt dieses Modell mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten überein? Wie können die erhaltenen Phosphorylierungsdaten der Proteinkinasen des ABA-Signalwegs in die Regulation der omnipräsenten Proteinphosphatase eingeflochten werden? Ein Versuch die Daten mit dem Modell in Einklang zu bringen ist in Abb. 4.10 illustriert.

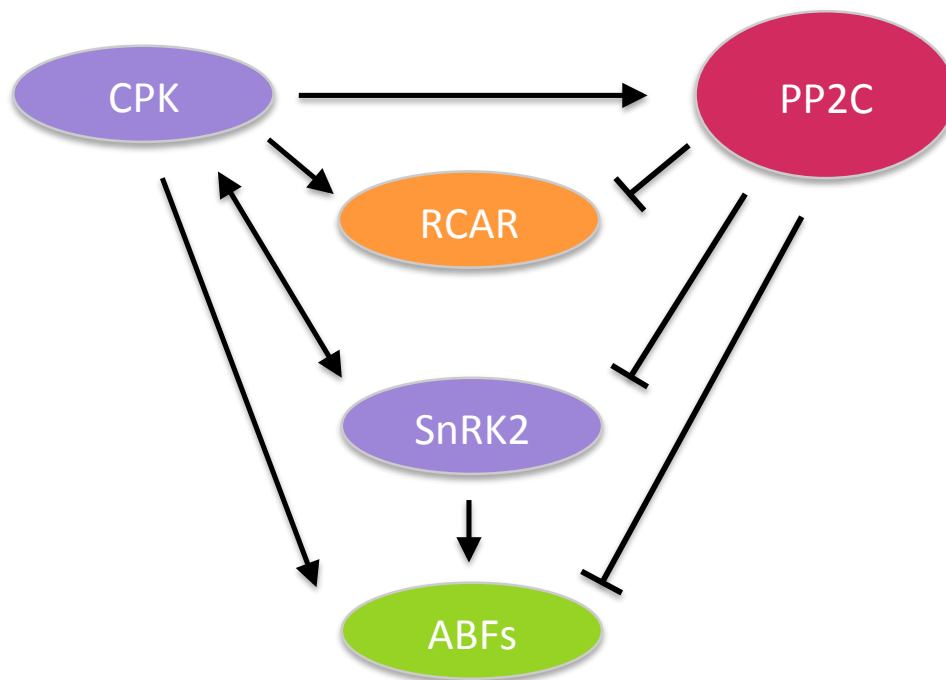


Abb. 4.10 Schematische Darstellung der gefundenen Interaktionen

Abbildung der bestätigten Interaktionen zwischen den Komponenten der ABA-Signaltransduktion. Der Einfluss der untersuchten Proteinkinasen (violette) auf die PP2C Proteinphosphatasen (rot), den RCAR ABA-Rezeptor (orange) und die Transkriptionsfaktoren (grün) wurden durch schwarze Pfeile symbolisiert, welcher für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinasen steht. Eine negative Regulation bzw. Dephosphorylierung der Komponenten durch die PP2C Proteinphosphatasen wurde durch schwarze Blockierungslinien dargestellt.

Aufgrund der in dieser Arbeit analysierten radioaktiven Proteinkinase-Aktivitätstests, Phosphatase-Aktivitätstests sowie *in vivo* Protoplasten-Experimente, liegen die untersuchten CPK Proteinkinasen nicht unterhalb der Regulationsebene der PP2C Phosphatasen, sondern Proteinphosphatase und Proteinkinase befinden sich auf einer Ebene, wenn nicht sogar die Proteinkinase oberhalb der Phosphatase. In diesem Fall würde der ABA-Regulationsweg mit den evolutionär entwickelten Stresssignalwegen in *Arabidopsis* (biotischer Stress), *Bacillus*, Hefe, *Drosophila* und Mensch übereinstimmen. Es scheint, dass die Signalkaskade über MAPK sowie MAPKK und MAPKKK eine Weiterentwicklung der in *Bacillus* etablierten Stresssignaltransduktion ist. Auch unter biotischen Stressbedingungen in *Arabidopsis* wird eine solche MAPK Kaskade ausgelöst. Warum soll *Arabidopsis* auf abiotischen Stress mit einer stark vereinfachten Signalkaskade von Rezeptor, Phosphatase, Proteinkinase und Transkriptionsfaktor antworten, obwohl theoretisch eine MAPK Signalweg möglich wäre? Sowohl der MAPK Signalweg als auch der ABA-Signalweg führt innerhalb kürzester Zeit zu einer zellulären Antwort. In Hefe kommt es innerhalb von Minuten durch die Phosphorylierung von Hog1 zu einem induzierten Wasserverlust der Zelle als Antwort auf hyperosmotischen Stress (Miermont *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2007; Hersen *et al.*, 2008). Ähnlich schnell verläuft auch die Regulation der Stomata in *Arabidopsis* aufgrund von abiotischen Stresssignalen (Allen *et al.*, 2001;

Christmann *et al.*, 2006). Beide Signalwege führen ihre Weiterleitung des Phosphorylierungssignals in einem engen Zeitfenster aus und unterliegen womöglich einer ähnlichen Regulation. Dafür sprechen die in dieser Arbeit enthaltenen Daten.

Erste Hinweise darauf lieferte die CPK Phosphorylierung der RCAR ABA-Rezeptoren, welche direkt das abiotische Stresshormon ABA binden können und dadurch den ABA-Signalweg aktivieren (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Während CPK21 in der Lage war alle RCAR Proteine *in vitro* zu phosphorylieren, wurden von CPK23L, CPK23C sowie OST1 nur einige RCARs selektiv phosphoryliert (Abb. 3.12). Bei einer *in vivo* Analyse der Phosphorylierungsstellen von RCAR9, RCAR10 und RCAR11 fielen besonders die Aminosäuren ins Auge, welche durch eine Phosphorylierungsmimikry in Form einer Aspartat-Substitution zu einer Inhibierung der ABA-Antwort führten. Dies war für RCAR9 Serin¹¹⁶ D, RCAR10 Serin¹⁰⁷ D sowie RCAR11 Serin¹²² D der Fall (Abb. 3.15). Die Befunde legen nahe, dass die Phosphorylierung des ABA-Rezeptors durch die Proteinkinasen Einfluss auf die gesamte ABA-Regulation nehmen kann. Durch eine *in vitro* Untersuchung der RCAR11 Serin¹²² D Variante im Phosphatase-Aktivitätstest mit PP2CA wurde diese Annahme bestätigt, denn aufgrund der Phosphorylierung an dieser Aminosäure des ABA-Rezeptors kam es zu einer Verschiebung der ABA-Sensitivität und damit zu einer verzögerten Inhibierung der Phosphatase durch ABA. Jedoch kann nicht nur eine Phosphorylierung an einer bestimmten RCAR Position zu einer Inhibierung des Signalwegs führen, auch die Mimikry einer dephosphorylierten Aminosäure in Form einer Alanin-Substitution führte für RCAR11 Serin⁴⁷ A, Serin⁶⁶ A sowie für Threonin¹⁰⁶ A zu einer negativen Regulation der ABA-Antwort im Vergleich zum Wildtyp RCAR11. Zusammenfassend kann für die Interaktion zwischen CPK Proteinkinasen und RCAR Rezeptor ein Regulationsmechanismus beschrieben werden, bei dem einerseits eine Phosphorylierung für eine ABA-Regulation notwendig ist (RCAR11 Serin⁴⁷ A), andererseits die ABA-Regulation durch eine Phosphorylierung inhibiert werden kann (RCAR11 Serin¹²² D).

Letztere erfolgte über die Beeinflussung der Interaktion zwischen RCAR, ABA und Phosphatase. Während die Phosphorylierung an RCAR11 Serin¹²² zu einer ABA-Insensitivität der Phosphatase führte, bewirkte eine direkte Interaktion der Proteinkinasen CPK23L und CPK21 mit PP2CA eine Steigerung der Phosphataseaktivität um das bis zu 3,5 fache (Abb. 3.31). Eine ähnliche Aktivierung wurde auch zwischen CPK12 und ABI2 beobachtet (Zhao *et al.*, 2011). Obwohl dieser Effekt auf die physikalische Interaktion zwischen Proteinkinase und Phosphatase zurückzuführen ist, konnte zudem eine enzymatische Interaktion festgestellt werden, indem eine Phosphorylierung der PP2C Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 durch die CPK Proteinkinasen beobachtet wurde (Abb. 3.26). Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Aktivität von CPK23L und CPK23C wird deutlich, dass CPK23L in der Lage ist die Phosphatase PP2CA sowohl zu phosphorylieren als auch zu

aktivieren. Im Gegensatz zu CPK23C, für welche weder eine PP2CA Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte noch eine interaktionsabhängige Aktivitätssteigerung dieser Phosphatase (Abb. 3.31; Abb. 3.26).

Bei der Auswertung dieser Versuche wurden nicht nur Diskrepanzen innerhalb der CPK Proteine detektiert, sondern auch ein gravierender Unterschied zwischen CPKs und der SnRK2 Proteinkinase OST1 aufgedeckt. Während die Autophosphorylierung der CPKs sowie die RCAR Phosphorylierung selbst in Abwesenheit von ABA nicht durch die aktiven Proteinphosphatasen dephosphoryliert wurde, war es für die SnRK2 Proteinkinase OST1 nicht möglich, selbst in Anwesenheit von ABA, sich selbst noch den RCAR11 Rezeptor zu phosphorylieren bzw. ihre Autophosphorylierung aufrecht zu erhalten (Abb. 3.26). Ein vergleichbares Ergebnis erhielt die Arbeitsgruppe von J. Schoeder bei der Analyse von CPK6 und OST1 in Anwesenheit der Proteinphosphatasen ABI1 und PP2CA (Brandt *et al.*, 2015; Brandt *et al.*, 2012). Ebenso wurde CPK11 in Lynch *et al.* (2012) trotz Anwesenheit verschiedener PP2Cs im Autoradiogramm phosphoryliert detektiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die SnRK2 Proteinkinase OST1 *downstream* der Phosphatasen agiert, während die CPK Proteinkinasen im Regulationsmechanismus oberhalb der Proteinphosphatasen anzusiedeln sind. Erhärtet wird diese Aussage durch die Untersuchung der Phosphorylierung an OST1 Serin¹⁷⁵, welches zum einen essentiell für die OST1 Proteinkinase-Aktivität ist, zum anderen durch die PP2C Proteinphosphatasen dephosphoryliert wird (Ng *et al.*, 2011). An dieser konservierten Position besitzen die CPK Proteine CPK23L, CPK23C und CPK21 ein Aspartat, was elektrostatisch einer dauerhaften Phosphorylierung entspricht, die nicht durch die PP2C Aktivität beeinflusst werden kann (Abb. 4.8 E). Im Vergleich mit weiteren Proteinkinasen wie PKA (*protein kinase A*), CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*) und PHK (*phosphorylase kinase*) wird dieser Regulationsmechanismus untermauert. Während die Proteinkinase PHK an dieser konservierten Position ein dem Aspartat ähnliches Glutamat trägt (Lowe *et al.*, 1997), muss eine Phosphorylierung von PKA an Threonin¹⁹⁷ bzw. von CDK2 an Threonin¹⁶⁰ vorgenommen werden, um eine aktive Kinase zu erlangen (Zheng *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1992; Nolen *et al.*, 2004). Ebenso wie OST1 tragen die Proteinkinasen SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.10 an dieser konservierten Stelle ein Serin. Eine Mutation von SnRK2.10 Serin¹⁵⁸ zu Serin¹⁵⁸ A führte zum Verlust der Kinaseaktivität (Vlad *et al.*, 2010).

Aus dieser Position heraus sind die CPK Proteinkinasen in der Lage ebenfalls auf die OST1 Proteinkinase einzuwirken. Dies zeigt sich anhand der intermolekularen Phosphorylierungsstelle an OST1 Serin¹⁵², welche im aktiven Zentrum der Proteinkinase liegt und dadurch möglicherweise für deren Aktivität von Relevanz ist. Eine negative Regulation von OST1 durch CPK23L wurde bereits in Wellmann (2012) bestätigt, wobei jedoch kein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung und einer bestimmten intermolekularen Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund

sollten genauere Untersuchungen des Effekts von OST1 Serin¹⁵² auf die Proteinkinase-Aktivität folgen. Neben der intermolekularen Phosphorylierung der CPKs an OST1 wurde jedoch auch eine entgegengesetzte intermolekulare Phosphorylierung an CPK23L durch OST1 detektiert. Das in Wellmann (2012) detektiert CPK23L Threonin²¹³, deren Alanin-Substitution einen negativen Effekt auf die CPK Aktivität hat, konnte jedoch in dieser Arbeit durch die massenspektrometrische Analyse nicht bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird von einer Interaktion zwischen den CPKs und OST1 ausgegangen, wobei deren gegenseitiger Regulationsmechanismus noch genauer analysiert werden muss.

Eine Analyse der Regulation zwischen den Proteinkinasen der ABA-Signaltransduktion und den ABRE bindenden Transkriptionsfaktoren bestätigte alle ABF Transkriptionsfaktoren und ABI5 als endogenes Substrat. Durch massenspektrometrische Analyse wurden die genauen Phosphorylierungsstellen bestimmt und deren Relevanz für die ABA-abhängige Genexpression untersucht. Dabei fielen besonders die *phosphosite* Mutationen von ABF1 Threonin³ D und ABF2 Serin⁴⁵ A ins Auge (Abb. 3.20). Beide Mutationen verursachten eine Inhibierung der ABA-Antwort, unabhängig davon ob und mit welcher Proteinkinase sie koexprimiert wurden. Dies könnte bedeuten, dass im Fall von ABF1 eine Phosphorylierung an Threonin³ den Transkriptionsfaktor direkt inhibieren könnte, während im Fall von ABF2 eine Phosphorylierung an Serin⁴⁵ essentiell wäre, um diesen Transkriptionsfaktor zu aktivieren (Abb. 3.20). Neben der Aktivierung oder Inhibierung kann auch die Stabilität eines Transkriptionsfaktors durch eine Phosphorylierung beeinflusst werden. So wurde gezeigt, dass der ABA-induzierte Transkriptionsfaktor ABF3 durch Phosphorylierung an der Position Threonin⁴⁵¹ eine Interaktion mit 14-3-3 Proteinen ermöglicht, wodurch der Abbau des Transkriptionsfaktors verhindert wird (Sirichandra *et al.*, 2010). Die dafür nötige Interaktionssequenz befindet sich in der C4 Domäne am C-Terminus der Proteine und liegt in den Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2, ABF3, ABF4 und ABI5 konserviert vor (Abb. 3.19; Abb. 4.5). Durch Deletion dieser C-terminalen Domäne in ABF1 und ABF3 wurde eine Destabilisierung des Proteins bestätigt (Chen *et al.*, 2013). Ebenso wurde in Lopez-Molina *et al.* (2001) ein Zusammenhang zwischen steigender ABA-Konzentration und induzierter Phosphorylierung von ABI5 beobachtet, die mit der Stabilisierung von ABI5 einherging (Lopez-Molina *et al.*, 2001). Um genaue Phosphorylierungsstellen der Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2 und ABF3 zu finden, welche durch die Proteinkinasen CPK23L, CPK23C, CPK21 und OST1 zu einer Induktion oder Inhibierung der ABA-Signaltransduktion führen, wurden die ABF *phosphosite* Mutationen und Proteinkinasen *in vivo* im transienten Expressionssystem koexprimiert. Eine deutliche Interaktion zwischen Transkriptionsfaktor und Proteinkinase war in der Koexpression von CPK21 und ABF2 zu erkennen. Die Phosphorylierungsmimikry ABF2 Threonin³¹ D war in der Lage eine dem Wildtyp entsprechende Induktion der ABA-Antwort zu bewirken und so die negative Regulation durch die CPK21 Proteinkinase komplett aufzuheben (Abb. 3.23). Im Umkehrschluss bedeutet dies,

dass eine Dephosphorylierung an dieser Stelle durch die PP2C Proteinphosphatasen absolut notwendig ist, um die Genexpression von ABF2 zu unterdrücken. Ähnlich verhält es sich in der Kombination von ABF2 mit CPK23L. Neben den Phospho-Varianten an ABF2 Threonin³¹ bewirkt vor allem eine dauerhafte Phosphorylierung an ABF2 Serin⁹⁴ den Transkriptionsfaktor zu aktivieren und vor der negativen Regulation durch CPK23L zu schützen. Diese Phosphorylierungsstelle ist auch in der Regulation durch die Proteinkinasen OST1 und CPK23C von Bedeutung. In beiden Fällen führt die Alanin-Substitution zu einer verringerten Aktivierung der ABA-Antwort durch die Proteinkinasen. Bleibt eine Phosphorylierung an ABF2 Serin⁹⁴ durch die Proteinkinasen des ABA-Signalwegs aus, wird nur noch eine rund 50%ige Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp erreicht. Zusammenfassend können die in den ABF Transkriptionsfaktoren gefundenen Phosphorylierungsstellen einen immensen Einfluss auf die ABA-Regulation nehmen. Als Beispiel führt eine dauerhafte Phosphorylierung an ABF2 Serin⁹⁴ zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors in Anwesenheit von CPK23L, jedoch nicht in Koexpression von CPK21. Zusätzlich verringert eine Alanin-Substitution dieser Aminosäure eine Aktivierung durch CPK23C und OST1. Die Übertragung einer Phosphorylierung an einen Transkriptionsfaktor bzw. Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen hat einen direkten Effekt auf die nachfolgende Genexpression (Lynch *et al.*, 2012; Boudsocq und Sheen, 2013).

Aufgrund dieser genannten Ergebnisse ergibt sich der in Abbildung 4.11 dargestellte hypothetische Regulationsmechanismus, dessen Rezeptormolekül nicht mehr eine Phosphatase sondern eine durch Calcium aktivierbare CPK Proteinkinase ist. Ähnlich der stressinduzierten Signalwege in Hefe, Mensch und dem biotischen Stressregulationsmechanismus in Arabidopsis beginnt die Signalperzeption im hypothetischen ABA-Signalweg mit einer Proteinkinase. So könnte CPK21, deren Aktivität *in vitro* stark calciuminduzierbar ist, durch diesen sekundären Botenstoff aktiviert werden und beginnen Substrate wie CPK23, RCAR, PP2Cs und ABFs zu phosphorylieren. Zwischen CPK21 und CPK23 könnte es sich vergleichbar zu CPK11 und CPK24 in der Regulation des Pollenschlauchwachstums verhalten (Zhao *et al.*, 2013). Während für CPK11 eine starke calciumabhängige Aktivierung nachgewiesen werden konnte, ist CPK24 calciumunabhängig und weist *in vitro* eine konstitutive Basalaktivität auf. Erhöht sich die zelluläre Calciumkonzentration, wird CPK11 aktiviert, welches den N-Terminus von CPK24 phosphorylieren kann. Diese Phosphorylierung ermöglicht es CPK24 spezifische Substrate wie K⁺ Kanäle zu inhibieren (Zhao *et al.*, 2013; Boudsocq *et al.*, 2012).

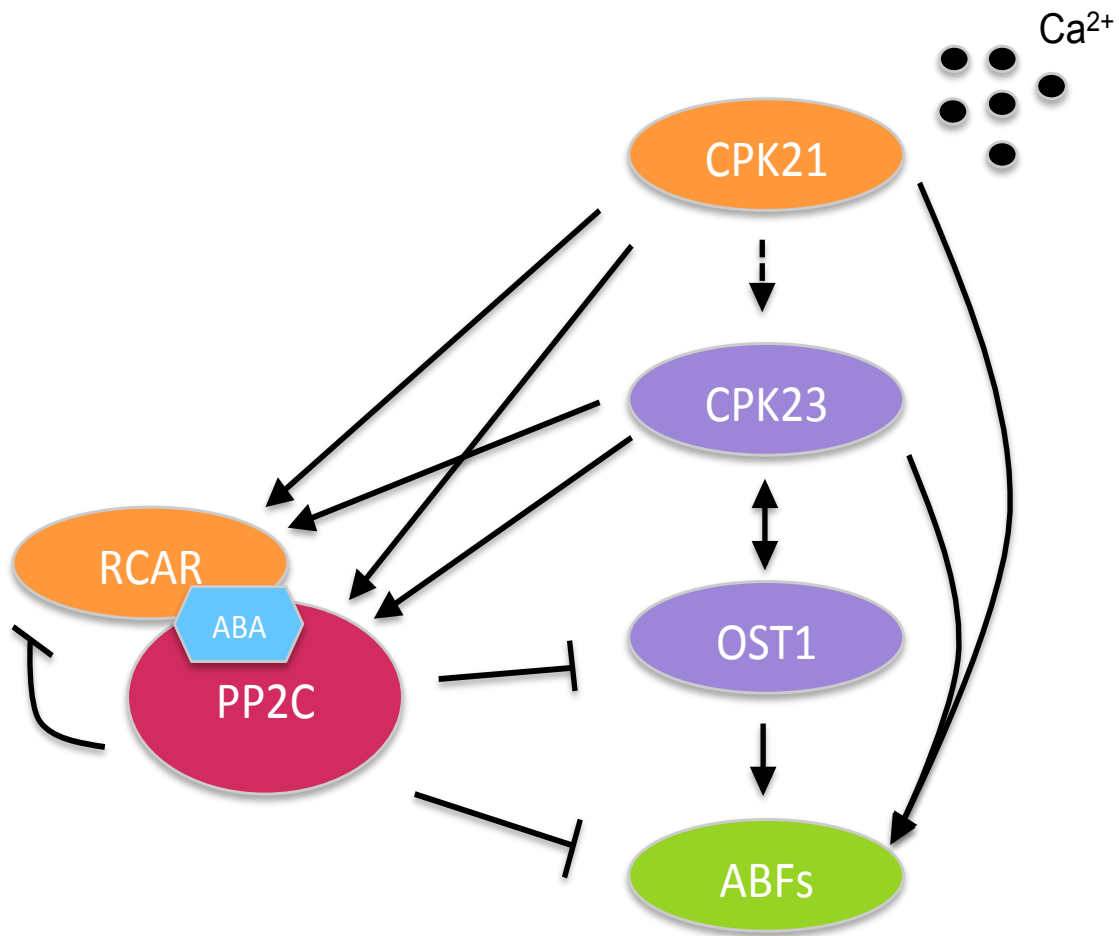


Abb. 4.11 Hypothetischer Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion

Darstellung des hypothetischen Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion, der sich aus den erhaltenen Daten dieser Arbeit sowie dem Vergleich der evolutionären Stresssignalkaskaden in Abbildung 4.9 zusammensetzt. Konsistent zu vorherigen Abbildungen sind Rezeptoren orange, Proteinkinasen violett, Proteinphosphatasen rot und Transkriptionsfaktoren grün markiert. An der Spitze der Signaltransduktion steht ähnlich zu *Bacillus* eine Hybrid-Proteinkinase CPK21, welche als *sensor responder* sowohl das Signal, in Form von Calciumionen aufnehmen als auch in ein Phosphorylierungssignal übersetzten kann. Dieses aktiviert möglicherweise CPK23 (unterbrochener Pfeil), welches im Zusammenspiel mit CPK21 sowohl die RCAR-abhängige Inhibierung der Phosphatase beeinflusst als auch die PP2C Phosphatase aktiviert. Dadurch wird OST1 sowohl durch CPK23 als auch durch die Dephosphorylierung durch PP2C reguliert. Ebenso beeinflusst die Dephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch die PP2C Proteinphosphatasen den Regulationsweg negativ, während aktive Proteinkinasen zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren beitragen. Bestätigte Phosphorylierungen wurden als schwarze Pfeile dargestellt. Eine mögliche Phosphorylierung bzw. Interaktion wurde durch einen unterbrochenen Pfeil symbolisiert. Durch die Proteinphosphatasen vollzogene Dephosphorylierungen wurden anhand einer Blockierungslinie dargestellt.

Im Vergleich zu den Proteinkinasen CPK23L und CPK21 des ABA-Signalwegs ist CPK21 die calciuminduzierbare Proteinkinase (Geiger *et al.*, 2010; Abb. 3.7 A), welche eventuell den N-Terminus von CPK23L phosphoryliert, woraufhin diese Proteinkinase spezifisch endogene Substrate phosphorylieren könnte. Diese These wird durch die Beobachtung in Abb. 3.34 gestützt, in der die Verkürzung des CPK23L N-Terminus um 14 Aminosäuren eine Aufhebung der negativen Regulation bewirkte. Innerhalb dieser 14 Aminosäuren befindet sich sowohl eine Autophosphorylierungsstellen von CPK23L an Serin⁶ als auch noch ein weiteres Serin⁵ sowie ein Threonin¹¹, welche mögliche intermolekulare Phosphorylierungsstellen von CPK21 darstellen könnten. Durch Übertragung des Phosphorylierungssignals an den CPK23L N-Terminus könnten nun beide Proteinkinasen durch Phosphorylierung definierter Aminosäuren die Interaktion zwischen RCAR und Proteinphosphatasen beeinflussen und zusätzlich zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren die ABA-abhängige Genexpression regulieren. Eine direkte Interaktion zwischen Proteinkinase und Proteinphosphatase kann zur Aktivierung der Phosphatase führen (Zhao *et al.*, 2011; Abb. 3.31). Die dadurch entstandene Inhibierung der ABA-Antwort könnte auf der Ebene der SnRK2 Proteinkinase OST1 und in der Dephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren greifen (Lynch *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2015; Abb. 3.26). Eine direkte Dephosphorylierung und Inhibierung der Proteinkinasen CPK23L, CPK23C und CPK21 durch die Proteinphosphatasen konnte weder in dieser Arbeit noch für CPK6 in Brandt *et al.* (2015) sowie für CPK11 in Lynch *et al.* (2012) gezeigt werden. Auch die in Brandt *et al.* (2015) detektierte Korrelation zwischen calciumabhängiger Regulation durch die CPK Proteinkinasen und calciumunabhängiger Regulation durch OST1 findet sich in diesem hypothetischen Modell wieder (Abb. 4.11). Unter Verwendung dieses Modells lassen sich auch die Ökotyp-spezifischen Unterschiede zwischen CPK23L und CPK23C beschreiben. CPK23L konnte *in vitro* die Aktivität der PP2CA Proteinphosphatase steigern und somit als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion fungieren. Hingegen war CPK23C dazu nicht in der Lage. So kam es in *in vivo* Analysen der transfizierten CPK23C Proteinkinase bereits in Abwesenheit von ABA zu einer ABA-abhängigen Induktion, welche sich durch die fehlende Aktivierung der Proteinphosphatasen durch CPK23C erklären lässt. Abschließend führen die in dieser Arbeit gezeigten Daten zu einem neuen hypothetischen Regulationsmechanismus der ABA-Signaltransduktion, ähnlich zu den biotischen Stresssignalkaskaden in Arabidopsis oder der Stresssignaltransduktion in Hefe und Mensch, in dem nach der Signalperzeption eine Proteinkinase als zentraler Regulator agiert.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Akaboshi, M., Hashimoto, H., Ishida, H., Saijo, S., Koizumi, N., Sato, M. und Shimizu, T. (2008). The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *Journal of Molecular Biology* 377, 246-257.

Al-Kaisi, M.M., Elmore, R.W., Guzman, J.G., Hanna, H.M., Hart, C.E., Helmers, M.J., Hodgson, E.W., Lenssen, A.W., Mallarino, A.P., Robertson, A.E., *et al.* (2013). Drought impact on crop production and the soil environment: 2012 experiences from Iowa. *Journal of Soil and Water Conservation* 68, 19A-24A.

Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., und Kudla, J. (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated Proteinkinases. *The EMBO Journal* 20, 1051-1063.

Allen, G. J., Chu, S. P., Schumacher, K., Shimazaki, C. T., Vafeados, D., Kemper, A. *et al.* (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis det3 mutant. *Science* 289, 2338–2342.

Allen, G. J., Chu, S. P., Harrington, C. L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y. Y. *et al.* (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053–1057.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. und Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699-711.

Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A. und Rodriguez, P.L. (2012). Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiology* 158, 970-980.

Antoniadi, I., Placková, L., Simonovik, B., Dolezal, K., Turnbull, C., Ljung, K. und Novák, O. (2015). Cell-type-specific cytokinin distribution within the Arabidopsis primary root apex. *The Plant Cell* July 2015 tpc.15.00176.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. und Sheen, J. (2002). MAP Proteinkinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977-983.

Bajguz, A. und Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 1–8.

Barah, P., Jayavelu, N.D., Mundy, J. und Bones, A.M. (2013). Genome scale transcriptional response diversity among ten ecotypes of Arabidopsis thaliana during heat stress. *Frontiers in Plant Science* 4:532.

Baril, C., und Therrien, M. (2006). Alphabet, a Ser/Thr phosphatase of the protein phosphatase 2C family, negatively regulates RAS/MAPK signaling in Drosophila. *Developmental biology* 294, 232-245.

Barrero, J. M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P.L., Ponce, M.R. und Micol, J.L. (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of Arabidopsis thaliana highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* 56, 2071–2083.

Ben-Ari, G. (2012). The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 31, 1357–1369.

- Bender, K.W. und Snedden, W.A. (2013). Calmodulin-related proteins step out from the shadow of their namesake. *Plant Physiology* 163, 486–495.
- Bertauche, N., Leung, J., und Giraudat, J. (1996). Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *European journal of biochemistry / FEBS* 241, 193-200.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B. und Brinkmann, V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein Kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 118, 503-514.
- Bishopp, A., Benkova, E. und Helariutta, Y. (2011). Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 10–16 .
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H. und Lauriere, C. (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein Kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41758–41766.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.H. und Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein Kinases. *Nature* 464, 418- 422.
- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Regad, L. und Laurière, C. (2012). Characterization of *Arabidopsis* calcium-dependent protein Kinases: activated or not by calcium? *The Biochemical Journal* 447, 291–299.
- Boudsocq, M. und Shenn, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. *Trends In Plant Science* 18, 30-40.
- Braam, J. (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* 165, 373–389.
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H. und Schroeder, J.I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 Kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 10593-10598.
- Brandt, B., Munemasa, S., Wang, C., Nguyen, D., Yong, T., Yang, P.G., Poretsky, E., Thomas F Belknap, T.F., Rainer Waadt, R., Alem, F. und Schroeder, J.I. (2015). Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. *eLife* 2015;4:e03599.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. und Neil, S.J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* 45, 113–122.
- Bruzzone, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A. *et al.* (2007). Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5759–5764.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. und Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 2763-2788.
- Bueso, E., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Gonzalez-Guzman, M., Sayas, E., Muñoz-Bertomeu, J., Ibañez, C., Serrano, R. und Rodriguez, P.L. (2014). The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *The Plant Journal* 80, 1057-1071.

- Bush, D.S., Biswas, A.K. und Jones, R.L. (1989). Gibberellic-acid-stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels. *Planta* 178, 411-420.
- Busk, P.K., und Pages, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37, 425-435.
- Caillaud, M.C., Asai, S., Rallapalli, G., Piquerez, S., Fabro, G. und Jones, J.D. (2013). A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in Arabidopsis by interacting with the host mediator complex. *PLoS Biology* 11, e1001732.
- Campos, M.L., Kang, J.H. und Howe, G.A. (2014). Jasmonate-Triggered Plant Immunity. *Journal of Chemical Ecology* 40, 657–675.
- Case, R.M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S. und Verkhatsky, A. (2007). Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42, 345–350.
- Chan, Z. (2012). Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Genomics* 100, 110–115.
- Chakraborty, S. und Newton, A.C. (2011). Climate change, plant diseases and food security. *Plant Pathology* 60, 2-14.
- Charpentier, M. und Oldroyd, G.E.D (2013). Nuclear calcium signaling in plants. *Plant Physiology* 163, 496–503.
- Chen, L.C., Chen, J.C., Shu, J.C., Chen, C.Y., Chen, S.C., Chen, S.H., Lin, C.Y., Lu, C.Y. und Chen, C.C. (2012). Interplay of RsbM and RsbK controls the sigma(B) activity of Bacillus cereus. *Environmental Microbiology* 14, 2788-2799.
- Chen, Y-T., Liu, H., Stone, S. und Callis, J. (2013). ABA and the ubiquitin E3 ligase KEEP ON GOING affect proteolysis of the Arabidopsis thaliana transcription factors ABF1 and ABF3. *The Plant Journal* 75, 965–976.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. und Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein Proteinkinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein Proteinkinase gene family. *Plant Physiology* 129, 469–485.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J. und Luan, S. (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein Proteinkinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 52, 223-239.
- Cherel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H. und Thibaud, J.B. (2002). Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *The Plant Cell* 14, 1133-1146.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., und Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. und Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275, 1723–1730.

- Choi, H., Park, H., Park, J.H., Kim, S., Im, M., Seo, H. *et al.* (2005): Arabidopsis calcium-dependent protein Kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology* *139*, 1750–1761.
- Choudhury, A. und Lahiri, A. (2011). Comparative analysis of abscisic acid-regulated transcriptomes in Arabidopsis. *Plant Biology* *13*, 28-35.
- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E. und Müller, A. (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiology* *137*, 209–219.
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y. und Grill, E. (2006). Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biology* *8*, 314–325.
- Christmann, A., Weiler, E.W., Steudle, E. und Grill, E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* *52*, 167–174.
- Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J.F. und Chazin, W.J. (2004). Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 29092-29100.
- Clark, R.M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P. *et al.* (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in Arabidopsis thaliana. *Science* *317*, 338-342.
- Clarkson, D.T, Brownlee, C. und Ayling S.M. (1988). Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2. *Journal of Cell Science* *91*, 71-80.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips A.L. und Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *The Journal of Experimental Biology* *217*, 67-75.
- Cornforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G. und Wareing, P. F. (1965). Chemistry and Physiology of 'Dormins' In Sycamore: Identity of Sycamore 'Dormin' with Abscisin II. *Nature* *205*, 1269–1270.
- Cuadrado, A. und Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical Journal* *429*, 403-417.
- Cutler, A. J. und J. E. Krochko (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends In Plant Science* *4*, 472-478.
- Cutler, P. (2004). *Protein Purification Protocols*. Springer Verlag.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. und Abrams, S.R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* *61*, 651–679.
- Czap, G. (2015). Die Proteinkinase CPK23, Ökotyp-spezifische Unterschiede und Funktion in der Abscisinsäure-Signaltransduktion. Dissertation. Technische Universität München.
- Daniel, X., Sugano, S und Tobin, E.M. (2004). CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 3292–3297.
- Davies, P.J. (2010). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Revised 3rd edn. Springer
- De Smet, I., Zhang, H., Inze, D. und Beeckman, T. (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* *11*, 434-439.

- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. und Ryals, J. (1994). A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
- Desriac, N., Broussolle, V., Postollec, F., Mathot, A.G., Sohier, D., Coroller, L. und Leguerinel, I. (2013). *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: toward the identification of potential biomarkers. *Frontiers in Microbiology* 4:284.
- Divi, U.K., Rahman, T. und Krishna, P. (2015). Gene expression and functional analyses in brassinosteroid-mediated stress tolerance. *Plant Biotechnological Journal*.
- Dodd, A.N., Love, J. und Webb, A.A.R. (2005). The plant clock shows its metal: Circadian regulation of cytosolic free Ca²⁺. *Trends in Plant Science* 10, 15–21.
- Dodd, A.N., Kudla, J. und Sanders, D. (2010) The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61, 593–620.
- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C.H., Chan, P.M., Bhalerao, R., Bennett, M.J. und Dinneny, J.R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25, 324-341.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.P., Schulze, W.X. und Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein Kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 8744-8749.
- Dupeux, F., Santiago, J., Betz, K., Twycross, J., Park, S.Y., Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Jensen, M.R., Krasnogor, N., Blackledge, M., *et al.* (2011). A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *The EMBO Journal* 30, 4171-4184.
- Eriksson, M.E. und Millar, A.J. (2003). The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant Physiology* 132, 732-738.
- Field, C.B., Barros, V.R., Mastrandrea, M.D. *et al.* (2014). Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. In WGII AR5 Phase I Report Launch
- Finkelstein, R.R. und Somerville, C.R. (1990). 3 classes of abscisic-acid (aba)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of aba responses. *Plant Physiology* 94, 1172-1179.
- Finkelstein, R.R. und Lynch, T.J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* 12, 599–609.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L. und Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14, 15-45.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., Lynch, T.J., Thomas, T.L. und Rock, C.D. (2005). Redundant and distinct functions of the ABA Response Loci *ABA-INSENSITIVE (ABI) 5* and *ABRE-BINDING FACTOR (ABF) 3*. *Plant Molecular Biology* 59, 253–267.
- Finkelstein, R.R., Reeves, W., Ariizumi, T. und Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59, 387-415.
- Franz, S., Ehlert, B., Liese, A., Kurth, J., Cazale, A.C. und Romeis, T. (2011). Calcium-dependent protein Kinase *CPK21* functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 4, 83-96.

- Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **87**, 651-660.
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I. und Schweighofer, A. (2012). Type 2C protein phosphatases in plants. *The FEBS Journal* **280**, 681-693.
- Fuchs, S. (2013). Protein Phosphatases 2C of *Arabidopsis thaliana* in Stress Signaling. Dissertation. Technische Universität München
- Fuchs, S., Tischer, S.V., Wunschel, C., Christmann, A. und Grill, E. (2014). Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 5741-5746.
- Fujii, H., Verslues, P.E. und Zhu, J.K. (2007). Identification of two protein Kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 485-494.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L. und Zhu, J.K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**, 660-664.
- Fujii, H. und Zhu, J.K. (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein Kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8380-8385.
- Fujii, H., Verslues, P.E. und Zhu, J.K. (2011). *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 Kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1717-1722.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436-442.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., *et al.* (2009). Three SnRK2 protein Kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **50**, 2123-2132
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* **124**, 509-525.
- Fujita, Y., Yoshida, T. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum* **147**, 15-27.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1988-1993.
- Gaengel, K., und Mlodzik, M. (2003). Egfr signaling regulates ommatidial rotation and cell motility in the *Drosophila* eye via MAPK/Pnt signaling and the Ras effector Canoe/AF6. *Development* **130**, 5413-5423.

- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., vanNeerven, R.J.J., Schou, C., Lowenstein, H. und Spangfort, M.D. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 3, 1040-1045.
- Gan, S. und Amasino, R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986-1988.
- Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., Shan, L. und He, P. (2013). Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein Kinases. *PLoS Pathog* 9(1): e1003127
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., *et al.* (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling Protein Kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 21425-21430.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., *et al.* (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein Kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8023-8028.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., *et al.* (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science signaling* 4, ra32.
- Gilli, R., Lafitte, D., Lopez, C., Kilhoffer, M.C., Makarov, A., Briand, C. und Haiech, J. (1998). Thermodynamic Analysis of Calcium and Magnesium Binding to Calmodulin. *Biochemistry* 37, 5450–5456.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pages, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C. *et al.* (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189–194.
- Gonzalez, A., Ruiz, A., Serrano, R., Arino, J. und Casamayor, A. (2006). Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 35057–35069.
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G.W., Fernández, M.A., Holdsworth, M.J., Perez-Amador, M.A., Kollist, H. und Rodriguez, P.L. (2012). Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* 24, 2483-2496.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A., Vartanian, N. und Giraudat, J. (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 11, 1897-1910.
- Goloudina, A.R., Tanoue, K., Hammann, A., Fourmaux, E., Le Guezennec, X., Bulavin, D.V., Mazur, S.J., Appella, E., Garrido, C. und Demidov, O.N. (2012). Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E68-75.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P. und Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3399-3414.
- Grones, P. und Friml, J (2015). Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science* 128, 1-7.

- Gu, Y., Rosenblatt, J. und Morgan, D.O. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr`160 and Tyr15. *The EMBO Journal* *11*, 3995-4005.
- Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R. und Quatrano, R. S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* *250*, 267–271
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.P., Gong, D., Halfter, U. und Zhu, J.K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein Protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell* *3*, 233-244.
- Halford, N.G. und Hardie, D.G. (1998). SNF1-related protein Protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology* *37*, 735-748.
- Hanano, S., Domagalska, M.A., Nagy, F. und Davis, S.J. (2006). Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells* *11*, 1381–1392.
- Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C. *et al.* (2007). A systems-biology analysis of feedback inhibition in the Sho1 osmotic-stress- response pathway. *Current Biology* *17*, 659–667.
- Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., Wu, J.Z., Wang, J., Yan, S.F. und Yan, N. (2011). The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Molecular Cell* *42*, 662-672.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein Protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 774-785.
- Harmon, A.C., Putnam-Evans, C. und Cormier, M.J. (1987). A calcium-dependent but calmodulin-independent protein Protein kinase from soybean. *Plant Physiology* *83*, 830–837.
- Harmon, A.C., Gribskov, M. und Harper, J.F. (2000). CDPKs—a Protein kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends in Plant Science* *5*, 154–159.
- Harper, J. F., Sussman, M.R., Schaller, G.E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H. und Harmon, A.C. (1991). A calcium-dependent protein Protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* *252*, 951–954.
- Harper, J.F., Huang, J.F. und Lloyd, S.J. (1994). Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein Protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* *33*, 7267-7277.
- Harper, J.F. und Harmon, A. (2005). Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*, 555-566.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C. und Leyser, O. (2009). Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiology* *151*, 400-412
- Hegeman, A.D., Rodriguez, M., Han, B.W., Uno, Y., Phillips, G.N., Hrabak, E.M. *et al.* (2006). A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein Protein kinases. *Proteomics* *6*, 3649– 3664.
- Hersen, P., McClean, M.N., Mahadevan, L. und Ramanathan, S. (2008). Signal processing by the HOG MAP Protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 7165–7170.
- Himmelbach, A., Iten, M. und Grill, E. (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* *353*, 1439–1444.

- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B. und Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 21, 3029–3038.
- Himmelbach, A., Yang, Y. und Grill, E. (2003). Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 470–479
- Hirayama, T. und Umezawa, T. (2010). The PP2C-SnRK2 complex: the central regulator of an abscisic acid signaling pathway. *Plant Signaling & Behavior* 5, 160-163.
- Hooley, R. (1994). Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Molecular Biology* 26, 1529-1555.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J., Hanafey, M.K., Tingey, S.V. und Chua, N. (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. *Journal of Cell Science* 115, 4891–4900.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., *et al.* (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein Kinases. *Plant Physiology* 132, 666-680.
- Huang, D., Jaradat, M.R., Wu, W., Ambrose, S.J., Ross, A.R., Abrams, S.R. und Cutler, A.J. (2007). Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal* 50, 414–428.
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S.R. und Cutler, A.J. (2008). The relationship of drought-related gene expression in Arabidopsis thaliana to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* 59, 2991-3007.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. und Schroeder, J.I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development* 24, 1695-1708.
- Hutchison, C.E und Kieber, J.J (2002). Cytokinin signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, S47-S59.
- Hwang, I., Sze, H. und Harper, J.F. (2000). A calcium-dependent protein Kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6224-6229.
- Imaizumi, T., Kay, S.A. und Schroeder, J.I. (2007). Circadian rhythms: Daily watch on Metabolism. *Science* 318, 1730-1731.
- Initiative, T.A.G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408, 796-815.
- Iten, M. (1992): Identifizierung und Charakterisierung von Abscisinsäure-insensitiven mutanten von Arabidopsis thaliana. Dissertation. ETH Zürich.
- Iten, M., Hoffmann, T. und Grill, E (1999). Receptors and signalling components of plant hormones. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research* 19, 41-58.
- Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. und Takahashi, Y. (2010). Alteration of substrate specificity: the variable N-terminal domain of tobacco Ca²⁺-dependent protein Kinase is important for substrate recognition. *The Plant Cell* 22, 1592-1604.
- Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. und Takahashi, Y. (2011). The mechanism of substrate recognition of Ca²⁺-dependent protein Kinases. *Plant Signaling & Behavior* 6, 924-926.

- Jadhav, A.S., Taylor, D.C., Giblin, M., Ferrie, A.M.R., Ambrose, S.J., Ross, A.R.S. *et al.* (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*. *Phytochemistry* **69**, 2678–2688.
- Jaiswal, J.K. (2001). Calcium – how and why? *Journal of Biosciences* **26**, 357-363.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F., und Group, b.I.P.R. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **7**, 106-111.
- Jaworski, K., Szmidszt-Jaworska, A., Tretyn, A. und Kopcewicz, J. (2003). Biochemical evidence for a calcium-dependent protein Kinase from *Pharbitis nil* and its involvement in photoperiodic flower induction. *Phytochemistry* **62**, 1047–1055.
- Johnson, C.H., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A. *et al.* (1995). Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* **269**, 1863–1865.
- Kang, J., Hwang, J.-U, Lee, M., Kim, Y.-Y, Assmann, S.M., Martinoia, E. und Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2355–2360.
- Kim, T., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. und Schroeder J.I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 561-591.
- Klee, H.J. (2004). Ethylene Signal Transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**, 660–667.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A. und Hattori, T. (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein Kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **44**, 939-949.
- Koornneef, M., Reuling, G. und Karssen, C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **61**, 377– 383.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. und Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 141-172.
- Korte, A. (2009). Identifizierung und Charakterisierung des Abscisinsäure- Responsregulators GCA2 in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Technische Universität München.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Griessem, W. und Luan, S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4718-4723.
- Kudla, J., Batistic, O. und Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell* **22**, 541-563.
- Kurland, I.J., el-Maghrabi, M.R., Correia, J.J. und Pilkis, S.J. (1992). Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Properties of phospho- and dephospho- forms and of two mutants in which Ser32 has been changed by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 4416-4423.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A. *et al.* (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2361–2366.

- Kurup, S., Jones, H.D. und Holdsworth, M.J. (2000). Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *The Plant Journal* 21, 143–155.
- Lan, W.Z., Lee, S.C., Che, Y.F., Jiang, Y.Q. und Luan, S. (2011). Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. *Molecular Plant* 4, 527-536.
- Larcher, W. (1987). Streß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 74, 158-167.
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W. *et al.* (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126, 1109–1120.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B und Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 21419-21424.
- Lefebvre, V., Kiani, S.P. und Durand-Tardif, M. (2009). A focus on natural variation for abiotic constraints response in the model species *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3547-3582.
- Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G. und Schroeder, J.I. (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant Cell* 16, 596-615.
- Leube, M.P., Grill, E. und Amrhein, N. (1998). ABI1 of Arabidopsis is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Letters* 424, 100-104
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F. und Giraudat, J. (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264, 1448- 1452.
- Leung, J., Merlot, S. und Giraudat, J. (1997). The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant cell* 9, 759-771.
- Li, A., Schuermann, D., Gallego, F., Kovalchuk, I. und Tinland, B. (2002). Repair of damaged DNA by Arabidopsis cell extract. *Plant Cell* 14, 263-273.
- Li, H.H., Hao, R.L., Wu, S.S., Guo, P.C., Chen, C.J., Pan, L.P. und Ni, H. (2011). Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochemical Pharmacology* 82, 701-712.
- Lichtenthaler, H.K. (1996). Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of plant physiology* 148, 4-14.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A. und Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 400, 271–274.
- Lobell, D.B. und Field, C.B. (2007). Global scale climate-crop yield relationships and the impact of recent warming. *Environmental research letters* 2, 014002.
- Lobell, D.B., Cassman, K.G. und Field, C.B. (2009). Crop Yield Gaps: Their Importance, Magnitudes, and Causes. *Annual Review of Environment and Resources* 34, 179-204.

- Lopez-Molina, L., Mongrand, S. und Chua, N. H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4782–4787.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Kinoshita, N. und Chua, N. (2003). AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes & Development* 17, 410–418.
- Love, J., Dodd, A.N. und Webb, A.A.R. (2004). Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 956-66.
- Lowe, E.D., Noble, M.E., Skamnaki, V.T., Oikonomakos, N.G., Owen, D.J. und Johnson, L.N. (1997). The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *The EMBO Journal* 16, 6646–6658.
- Lu, X., Ma, O., Nguyen, T.A., Jones, S.N., Oren, M. und Donehower, L.A. (2007). The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* 12, 342–354.
- Luehrsen, K.R., De Wet, J.R. und Walbot, V. (1992). Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods in Enzymology* 216, 397-414.
- Lynch, T., Erickson, B.J. und Finkelstein, R.R. (2012). Direct interactions of ABA-insensitive(ABI)-clade protein phosphatase(PP)2Cs with calcium-dependent protein Kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant Molecular Biology* 80, 647-658.
- Ma, S.Y. und Wu, W.H. (2007). AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Molecular Biology* 65, 511-518.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. und Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* 324, 1064-1068.
- Marcus, F., Rittenhouse, J., Moberly, L., Edelstein, I., Hiller, E. und Rogers, D.T. (1988). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase. Properties of phospho and dephospho forms and of two mutants in which serine 11 has been changed by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 263, 6058-6062.
- Martí, M.C., Stancombe, M.A. und Webb, A.A.R (2013). Cell- and stimulus type-specific intracellular free Ca²⁺ signals in arabidopsis. *Plant Physiology* 163, 625–634.
- Martín, M.L. und Busconi, L. (2000). Membrane localization of a rice calcium-dependent protein Kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *The Plant Journal* 24, 429-435.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W.X., Legen, J., Hilger, H.H. und Romeis, T. (2013). Function of calcium-dependent protein Kinase CPK28 of Arabidopsis thaliana in plant stem elongation and vascular development. *The Plant Journal* 73, 883-896.
- McAinsh, M.R., Webb, A.A.R., Taylor, J.E. und Hetherington, A.M. (1995). Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Cell* 7, 1207-1219.
- Meinhard, M., Rodriguez, P.L. und Grill, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* 214, 775-782.
- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S.Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., *et al.* (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462, 602-608.

- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. und Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 25, 295-303.
- Meyre, D., Leonardi, A., Brisson, G. und Vartanian, N. (2001). Drought-adaptive mechanisms involved in the escape/tolerance strategies of *Arabidopsis Landsberg erecta* and Columbia ecotypes and their F1 reciprocal progeny. *Journal of Plant Physiology* 158, 1145-1152.
- Miermont, A., Uhlendorf, J., McClean, M. und Hersen, P. (2011). The dynamical systems properties of the HOG signaling cascade. *Journal of Signal Transduction* 2011, 1–12.
- Mihaylova, M.M. und Shaw, R.J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology* 13, 1016-1023.
- Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Tanokura, M. (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science* 18, 259–266.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., *et al.* (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462, 609-614.
- Moes, D., Himmelbach, A., Korte, A., Haberer, G. und Grill, E. (2008). Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 54, 806-819.
- Mogami, J., Fujita, Y., Yoshida, T., Tsukiori, Y., Nakagami, H., Nomura, Y. *et al.* (2015). Two distinct families of protein Kinases are required for plant growth under high external Mg²⁺ concentrations in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 167, 1039–1057.
- Monaghan, J., Matschi, S., Shorinola, O., Rovenich, H., Matei, A., Segonzac, C., Gro-Malinovsky, F., Rathjen, J., MacLean, D., Romeis, T., *et al.* (2014). The calcium dependent protein Kinase CPK28 buffers plant immunity and regulates BIK1 turnover. *Cell Host & Microbe* 16, 605-615.
- Monaghan, J., Matschi, S., Romeis, T. und Zipfel, C. (2015). The calcium-dependent protein Kinase CPK28 negatively regulates the BIK1-mediated PAMP-induced calcium burst. *Plant Signal & Behavior* 10(5):e1018497.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y., Andreoli, S. *et al.* (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca²⁺- Permeable Channels and Stomatal Closure. *Plos Biology* 4, e327.
- Mosquna, A., Peterson, F.C., Park, S.Y., Lozano-Juste, J., Volkman, B.F. und Cutler, S.R. (2011). Potent and selective activation of abscisic acid receptors in vivo by mutational stabilization of their agonist-bound conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 20838-20843.
- Muniz Garcia, M.N., Giammaria, V., Grandellis, C., Tellez-Inon, M.T., Ulloa, R.M. und Capiati, D.A. (2012). Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from *Solanum tuberosum* L. that is phosphorylated by StCDPK2 in vitro. *Planta* 235, 761-778.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. und Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140, 249–262.
- Mustilli, A., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. und Giraudat, J. (2002). *Arabidopsis* OST1 protein Kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14, 3089–3099.

- Müssig, C. und Altmann, T. (1999). Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 363–372.
- Myers, C., Romanowsky, S.M., Barron, Y.D., Garg, S., Azuse, C.L., Curran, A., Davis, R.M., Hatton, J., Harmon, A.C. und Harper, J.F. (2009). Calcium-dependent protein Kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *The Plant Journal* 59, 528-539.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., *et al.* (2009). Three Arabidopsis SnRK2 protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant & Cell Physiology* 50, 1345-1363.
- Negi, S., Ivanchenko, M. und Muday, G. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55, 175-187.
- Nemhauser, J.L., Hong, F. und Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467–475.
- Ng, L.-M., Soon, F.-F., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Suino-Powell, K.M. *et al.* (2011). Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 Kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 21259–21264.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R. *et al.* (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326, 1373–1379.
- Nolen, B., Taylor, S. und Ghosh, G. (2004). Regulation of protein Kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell* 15, 661–675.
- Novakova, M., Motyka, V., Dobrev, P.I., Malbeck, J., Gaudinova, A. und Vankova, R. (2005). Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* 56, 2877–2883.
- Oh, M.H., Wu, X., Kim, H.S., Harper, J.F., Zielinski, R.E., Clouse, S.D. und Huber, S.C. (2012). CDPKs are dual-specificity protein Kinases and tyrosine autophosphorylation attenuates Kinase activity. *FEBS Letters* 586, 4070-4075.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T. und Smith, O.E. (1963). Abscisin II, an abscission- accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142, 1592-1593.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. und Zhu, J.K. (2003). A novel domain in the protein Kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11771-11776.
- Pachauri, R.K. und Reisinger, A. (2007). *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., *et al.* (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068-1071.
- Park, S.Y., Peterson, F.C., Mosquna, A., Yao, J., Volkman, B.F. und Cutler, S.R. (2015). Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. *Nature* 520, 545-548.
- Patton, C., Thompson, S. und Epel, D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* 35, 427–431.

- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J. *et al.* (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731–734.
- Peterson, O.H., Burdakov, D. und Tepikin, A.V. (1999). Polarity in intracellular calcium signaling. *Bioessays* **10**, 851–860.
- Peterson, F.C., Burgie, E.S., Park, S.Y., Jensen, D.R., Weiner, J.J., Bingman, C.A., Chang, C.E., Cutler, S.R., Phillips, G.N., Jr. und Volkman, B.F. (2010). Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 1109–1113.
- Poovaliah, B.W., Du, L., Wang, H. und Yang, T. (2013). Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant Physiology* **163**, 531–542.
- Qiu, J.L., Zhou, L., Yun, B.W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., Mackinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J. und Morris, P.C. (2008). Arabidopsis mitogen-activated protein Kinase Proteinkinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology* **148**, 212–222.
- Radchuk, R., Emery, R.J., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J.E., Feil, R., Weschke, W. und Weber, H. (2010). Sucrose non-fermenting Protein Kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **61**, 324–338.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. und Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* **15**, 395–401.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. und Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant Journal* **68**, 100–113.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Fröhlich, K., Westphal, L., Scheel, D. und Lee, J. (2014). Microbe-associated molecular pattern-induced calcium signaling requires the receptor-like cytoplasmic Protein Kinases, PBL1 and BIK1. *BMC Plant Biology* **14**, 374.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R. und Hill, R.D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**, 290–294.
- Reeves, W.M., Lynch, T.J., Mobin, R. und Finkelstein, R.R. (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Molecular Biology* **75**, 347–363.
- Rejeb, I.B., Pastor, V. und Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants* **3**, 458–475.
- Reyes, D., Rodríguez, D., González-García, M.P., Lorenzo, O., Nicolás, G., García-Martínez, J.L. und Nicolás, C. (2006). Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in Arabidopsis shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **141**, 1414–1424.
- Risk, J.M., Macknight, R.C. und Day, C.L. (2008). FCA does not bind abscisic acid. *Nature* **456**, S. E5–E6.
- Roberts, D.M. und Harmon, A.C. (1992). Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 375–414.
- Robertson, F.C., Skeffington, A.W., Gardner, M.J. und Webb, A.A. (2009). Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Molecular Biology* **69**, 419–427.

- Robinson, S.P., Streusand, V.J., Chatfield, J.M. und Portis, A.R. (1988). Purification and assay of rubisco activase from leaves. *Plant Physiology* *88*, 1008-1014.
- Romeis, T., Piedras, P. und Jones, J.D.G. (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein Kinase in the plant defense response. *Plant Cell* *12*, 803-816.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R. und Jones, J.D. (2001). Calcium-dependent protein Kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal* *20*, 5556– 5567.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumberras, V., González-Guzmán, M., Antoni, R., Rodriguez, P.L. und Baena-González, E. (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein Kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* *25*, 3871-3884.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M. und Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein Kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* *61*, 621-649.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I. und Rodriguez, P.L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiology* *150*, 1345-1355.
- Ryan, C.A. und Pearce, G. (2003). Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 14577–14580.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R. und 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. *Plant Physiology* *141*, 1389-1399.
- Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F.J. und Goloubinoff, P. (2009). The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *Plant Cell* *21*, 2829–2843.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 18822–18827.
- Sanchez, J.P., Duque, P. und Chua N.H. (2004). ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Journal* *38*, 381-395.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. und Harper, J.F (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, S401–S417.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.Y., Jamin, M. *et al.* (2009a). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* *462*, 665–668.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., *et al.* (2009b). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of cladeA PP2Cs. *The Plant Journal* *60*, 575–588.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., *et al.* (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. *The Biochemical Journal* *424*, 439-448.

- Schaller, G.E., Bishopp, A. und Kieber, J.J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* 27, 44-63.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. und Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 627–658.
- Schulz, P., Herde, M. und Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein Kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiology* 163, 523–53.
- Schwartz, S. H., Qin X. und Zeevaart, J.A. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25208-11.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., *et al.* (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 31, 279-292.
- Senis, Y.A. (2013). Protein-tyrosine phosphatases: a new frontier in platelet signal transduction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11, 1800-1813.
- Seung, D., Risopatron, J.P., Jones, B.J. und Marc, J. (2012). Circadian clock-dependent gating in ABA signalling networks. *Protoplasma* 249, 445-457.
- Shaw, S.L. und Long, S.R. (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiology* 131, 976–984.
- Sheen, J. (1996). Ca²⁺-dependent protein Kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274, 1900-1902.
- Sheen, J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 975-980.
- Shen, Q., Zhang, P. und Ho T.H. (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for aba induction of gene expression in barley. *The Plant Cell* 8, 1107-1119.
- Sirichandra, C., Davanture, M., Turk, B.E., Zivy, M., Valot, B., Leung, J. *et al.* (2010). The Arabidopsis ABA-Activated Protein Kinase OST1 Phosphorylates the bZIP Transcription Factor ABF3 and Creates a 14-3-3 Binding Site Involved in Its Turnover. *PLoS One* 5, e13935.
- Somerville, C. und Koornneef, M. (2002). Timeline - A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3, 883-889.
- Soon, F.F., Ng, L.M., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Tan, M.H., Suino-Powell, K.M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M.J., *et al.* (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 Protein Kinases and PP2C phosphatases. *Science* 335, 85-88.
- Spoel, S.H und Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe* 3, 348-351.
- Stael, S., Bayer, R.G., Mehlmer, N. und Teige, M. (2011). Protein N-acylation overrides differing targeting signals. *FEBS Letters* 585, 517–522.
- Stone, S.L., Williams, L.A., Farmer, L.M., Vierstra, R.D. und Callis, J. (2006). KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 18, 3415-3428.

- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C. und Harper, J.F. (2000). Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 433-462.
- Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A. und Grill, E. (2010). Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 61, 25-35.
- Tallman, G. (2004). Are diurnal patterns of stomatal movement the result of alternating metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration? *Journal of Experimental Botany* 55, 1963–1976.
- Thorsness, P. E. und Koshland, D. E., Jr. (1987). Inactivation of Isocitrate Dehydrogenase by Phosphorylation Is Mediated by the Negative Charge of the Phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 262, 10422-10425.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. und Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein Kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17588-17593.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11632-11637.
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N. und Shinozaki, K. (1994). Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein Kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 244, 331–340.
- van Ittersum, M.K., Cassman, K.G., Grassini, P., Wolf, J., Tittonell, P. und Hochman, Z. (2013). Yield gap analysis with local to global relevance. *Field Crops Research* 143, 4-17.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Lauriere, C. und Merlot, S. (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related Protein Kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 3170–3184.
- Vlad, F., Droillard, M.J., Valot, B., Khafif, M., Rodrigues, A., Brault, M., Zivy, M., Rodriguez, P.L., Merlot, S. und Lauriere, C. (2010). Phospho-site mapping, genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 63, 778-790.
- Wang, Y.F., Munemasa, S., Nishimura, N., Ren, H.M., Robert, N., Han, M., Puzörjova, I., Kollist, H., Lee, S., Mori, I. und Schroeder, J.I. (2013a). Identification of cyclic GMP-activated nonselective Ca²⁺-permeable cation channels and associated CNGC5 and CNGC6 genes in Arabidopsis guard cells. *Plant Physiology* 163, 578-590.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Lu, Y., Chen, X. und Wu, Y. (2013b). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 64, 675-684.
- Webb, A.A. und Hetherington, A. M. (1997). Convergence of the abscisic acid, CO₂, and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells. *Plant Physiology* 114, 1557–1560.
- Webb, A.A (2013). Focus Issue: Calcium Signaling. *Plant Physiology* 163, 457–458.
- Wellmann, C. (2012). Charakterisierung der calciumabhängigen Protein Kinase GCA2 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Technische Universität München.

- Wernimont, A.K., Artz, J.D., Finerty, P., Lin, Y.H., Amani, M., Allali-Hassani, A. *et al.* (2010). Structures of apicomplexan calcium-dependent protein Kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nature Structural & Molecular Biology* *17*, 596–601.
- Wernimont, A.K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J.C., Artz, J.D., Lin, Y.H. *et al.* (2011). Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins* *79*, 803–820.
- Weiner, J.J., Peterson, F.C., Volkman, B.F. und Cutler, S.R. (2010). Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology* *13*, 495-502.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. und Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 10487-10492.
- Wilkinson, S., Kudoyarova, G.R., Veselov, D.S., Arkhipova, T.N. und Davies, W.J. (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany* *63*, 3499-509.
- Wilson, R.L., Kim, H., Bakshi, A. und Binder, B.M. (2014). The Ethylene Receptors ETHYLENE RESPONSE1 and ETHYLENE RESPONSE2 Have Contrasting Roles in Seed Germination of Arabidopsis during Salt Stress. *Plant Physiology* *165*, 1353-1366.
- Wu, Y., Sanchez, J.P., Lopez-Molina, L., Himmelbach, A., Grill, E. und Chua N.H. (2003). The *abi1-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *The Plant Journal* *34*, 307-315.
- Xia, Y., Yang, Q., Gong, X., Ye, F. und Liou, Y.C. (2011). Dose-dependent mutual regulation between Wip1 and p53 following UVC irradiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *43*, 535-544.
- Xie, T., Ren, R., Zhang, Y.Y., Pang, Y., Yan, C., Gong, X., He, Y., Li, W., Miao, D., Hao, Q., *et al.* (2012). Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the Arabidopsis thaliana abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *The Journal of Biological Chemistry* *287*, 794-802.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L. und Wu, W.H. (2006). A protein Kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* *125*, 1347-1360.
- Xu, Z.Y., Lee, K.H., Dong, T., Jeong, J.C., Jin, J.B., Kanno, Y., Kim, D.H., Kim, S.Y., Seo, M., Bressan, R.A., Yun, D.J. und Hwang, I. (2012). A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* *24*, 2148-2199.
- Xue, S., Hu, H., Ries, A., Merilo, E., Kollist, H. und Schroeder, J.I. (2011). Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein Kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *The EMBO Journal* *30*, 1645-1658.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehlting, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C. und Zhong, Y. (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* *9*, 550.
- Yang, M., Song, S., Liu, G., Chen, K., Tian, X., Zhao, Z.J., Hu, S. und Yu, J. (2010). A comprehensive analysis of protein phosphatases in rice and Arabidopsis. *Plant Systematics and Evolution* *289*, 111-126.

- Yang, Y., Sulpice, R., Himmelbach, A., Meinhard, M., Christmann, A. und Grill, E. (2006). Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid- mediated photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 6061-6066.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y. *et al.* (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* *16*, 1230–1236.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R. und Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein Kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* *43*, 1473-1483.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F. und Shinozaki, K. (2006). 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. *The Journal of Biological Chemistry* *281*, 5310-5318.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. und 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. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* *61*, 672-685.
- Yoshida, T., Mogami, J. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. *Plant Cell Physiology* *56*, 1043-1052.
- Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S. und Ota, I. (2002). Role of Ptc2 Type 2C Ser/Thr Phosphatase in Yeast High-Osmolarity Glycerol Pathway Inactivation. *Eukaryotic Cell* *1*, 1032-1040.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E. und Schroeder, J.I. (2006). CO₂ signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 7506–7511.
- Zhang, M. und Yuan, T. (1998). Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility. *Biochemistry and Cell Biology* *76*, 313–323.
- Zhang, X.S und Choi, J.H. (2001). Molecular evolution of calmodulin-like domain protein Kinases (CDPKs) in plants and protists. *Journal of Molecular Evolution* *53*, 214-224.
- Zhao, Y., Pokutta, S., Maurer, P., Lindt, M., Franklin, R.M. und Kappes, B. (1994). Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein Kinases from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium- binding sites for Protein Kinase activation. *Biochemistry* *33*, 3714–3721
- Zhao, R., Wang, X.F. und Zhang, D.P. (2011). CPK12: A Ca²⁺-dependent protein Kinase balancer in abscisic acid signaling. *Plant Signaling & Behavior* *6*, 1687-1690.
- Zhao, L.N., Shen, L.K., Zhang, W.Z., Zhang, W., Wang, Y. und Wu, W.H. (2013). Ca²⁺-dependent protein Kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K⁺ channels in Arabidopsis pollen tubes. *The Plant Cell* *25*, 649-661.
- Zheng, J., Trafny, E.A., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Ten Eyck, L.F. und Sowadski, J.M. (1993). 2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* *49*; 362-365.

LITERATURVERZEICHNIS

Zheng, L., Baumann, U. und Reymond, J-L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research* 32, No. 14 e115.

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., *et al.* (2007). Two calcium-dependent protein Kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19, 3019-3036.

Zou, J.J., Wei, F.J., Wang, C., Wu, J.J., Ratnasekera, D., Liu, W.X. und Wu, W.H. (2010). Arabidopsis calcium-dependent protein Kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiology* 154, 1232-1243.

6. ANHANG

6.1 Coomassie-Gel der RCAR Proteine

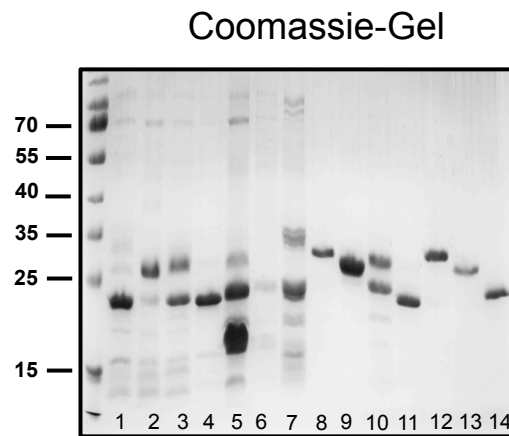


Abb. 6.1 Coomassie-Gel der RCAR Proteine

Zur Bestimmung der genauen Proteinkonzentration der jeweiligen RCAR Proteine wurde je 0,5 µg Protein mit 10-fachen SDS-Probenpuffers vermischt und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Dieses wurde nach dem Gellauf mit Färbelösung (25% 2-Propanol, 10% Essigsäure, 0,05% Coomassie Brillantblau R-250) 10 min gefärbt und rund 1 Stunde in 10%iger Essigsäure entfärbt. Zahlen stehen für die Nummerierung der RCAR Proteine. In der ersten Spur wurde der SDS-Standard *PageRuler prestained* aufgetragen.

6.2 Western Blot der GST-Fusionsproteine

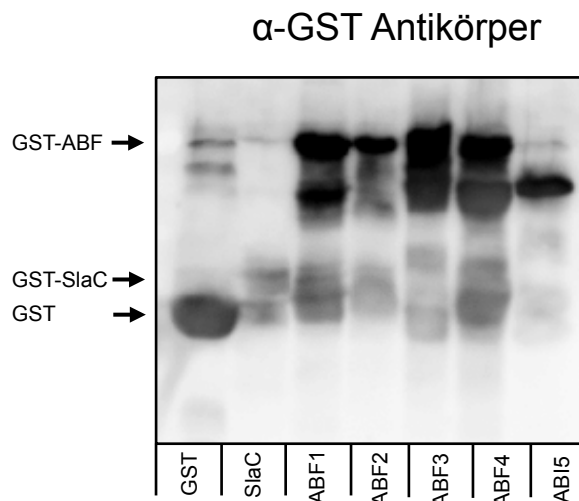


Abb. 6.2 Western Blot der GST-Fusionsproteine

Zum Nachweis der Fusionsproteine, Überprüfung des Reinigungserfolges sowie zur Konzentrationsabschätzung wurde ein Western Blot der rekombinant gereinigte GST-Fusionsproteine verwendet. Dazu wurde 1 µg der Proteine mit 10-fachen SDS-Probenpuffer versetzt und die Proben auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf und Blot-Verfahren wurde die Membran jeweils eine Stunde mit primären α-GST-Antikörper, sowie nach Waschschrinen, mit sekundären Antikörper inkubiert. Zur Auswertung wurde die Chemilumineszenz des Luminol-Umsatzes durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte HR-Peroxidase verwendet. Die Belichtungszeit zur Detektion der Chemilumineszenz betrug 5 min.

6.3 Verwendete Bakterienstämme

Strainlist-#	Organismus	Stamm	Plasmid/Vector	Resistenz
400	EC	DH5a	pSK+	Amp
883	EC	DH5a	pSK35SWGUS	Amp
2023	EC	M15	pQE70 ABI2 pREP4	Amp,Kan
2158	EC	M15	pQE70 ABI 1 REP4	Amp,Kan
2704	EC	BL21 (DE3)	pQE-70 RCAR11	Amp
2760	EC	BL21(DE3)	pQE-70 ABI2	Amp
3041	EC	DH5a	pSK pRD29B::LUC new	Amp
3346	EC	XL1 blue	pBI221::p35S::ABI5	amp
3598	EC	XL1 blue	pBI221 35s ABF1	Amp
3979	EC	CH	pBI221 35s:: CPK21 vk	Amp
4063	EC	DH5a	pSK Ascl 35S PP2CA	Amp
4099	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR11	Amp
4277	EC	M15	pQE70 OST 1	Amp
4278	EC	M15	pQE70 RCAR 1	Amp
4279	EC	M15	pQE70 RCAR 9	Amp
4282	EC	M15	pQE70 RCAR 11	Amp
4283	EC	M15	pQE70 GCA2 FL WT	Amp
4286	EC	M15	pQE70 GCA2 FL TK	Amp
4287	EC	M15	pQE70 GCA2 VK	Amp
4289	EC	M15	pQE70 ost 1 TK	Amp
4297	EC	XL1 blue	pSK Ascl 35S GCA2 VL	Amp
4298	EC	XL1 blue	pSK Ascl 35S GCA2 VK	Amp
4392	EC	DH5 α	pSK35S RCAR9	Amp
4393	EC	DH5 α	pSK35S RCAR10	Amp
4479	EC	XL1 blue	pQE70 ABI1	Amp
4502	EC	XL1 blue	psk 35s ABF2 CDS	Amp
4565	EC	XL1 blue	p35S CPK23 Col VK	Amp
4846	EC	DH5 α	pQE70 PP2C #6	Amp
4847	EC	DH5 α	pSK 35S PP2C #6	Amp
5091	EC	XL1blue	pQE70 gca2 S386D	Amp
5093	EC	XL1blue	pQE70 GCA2 Q393E	Amp
5230	SF	DH5a	pSK 35S ABF3	Amp
5233	SF	DH5a	pSK 35S ABF4	Amp
5240	EC	XL1Blue	pQE70_CPK23(Ler)_fl/fl	Amp
5241	EC	XL1Blue	pQE-70_CPK23(Ler)_ Δ 64/fl	Amp
5242	EC	XL1Blue	pQE-70_CPK23(Ler)_ Δ 14/vK	Amp
5243	EC	XL1Blue	pQE-70_CPK23(Ler)_ Δ 64/vK	Amp
5244	EC	XL1Blue	pQE-70_CPK23(Col)_ Δ 64/fl	Amp
5245	EC	XL1Blue	pQE-70_CPK23(Col)_ Δ 58/vK	Amp
5246	EC	XL1Blue	pQE-70_CPK23(Col)_ Δ 64/vK	Amp
5263	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Col)_fl/fl	Amp
5264	EC	M15	pQE-70_CPK23(Col)_fl/fl	Amp, Kan

ANHANG

5271	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ58/vK	Amp
5272	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Col)_Δ14/fl	Amp
5273	EC	M15	pQE-70_CPK23(Ler)_fl/fl	Amp, Kan
5274	EC	M15	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ64/fl	Amp, Kan
5275	EC	M15	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ14/vK	Amp, Kan
5276	EC	M15	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ58/vK	Amp, Kan
5277	EC	M15	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ64/vK	Amp, Kan
5278	EC	M15	pQE-70_CPK23(Col)_Δ14/fl	Amp, Kan
5279	EC	M15	pQE-70_CPK23(Col)_Δ64/fl	Amp, Kan
5280	EC	M15	pQE-70_CPK23(Col)_fl/vk	Amp, Kan
5281	EC	M15	pQE-70_CPK23(Col)_Δ58/vK	Amp, Kan
5282	EC	M15	pQE-70_CPK23(Col)_Δ64/vK	Amp, Kan
5283	EC	XL1blue	pQE 70 Cpk23 (fl) S 362 I	Amp
5284	EC	XL1blue	pQE 70 Cpk23 (fl) Q 393 E	Amp
5286	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ14/fl	Amp
5287	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ32/fl	Amp
5288	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ58/fl	Amp
5289	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Ler)_fl/vK	Amp
5290	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Col)_Δ32/fl	Amp
5291	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Col)_Δ58/fl	Amp
5362	EC	XL1blue	pQE70 cpk23 (fl) D193A	Amp
5363	EC	XL1blue	pQE70 cpk23 (vk) D193A	Amp
5456	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Ler)_Δ32/vk	Amp
5457	EC	XL1blue	pQE-70_CPK23(Col)_Δ14/vk	Amp
5844	EC	XL1blue	pQE70 OST1 TK eGFP	Amp
5845	EC	XL1blue	pQE70 OST1 eGFP	Amp
5846	EC	XL1blue	pQE70 GCA2 eGFP	Amp
5847	EC	XL1blue	pQE7 0GCA2 TK eGFP	Amp
5983	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S16 A 1	Amp
5984	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S 16 D 1	Amp
5985	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S 31 A 2	Amp
5986	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S31D 2	Amp
5987	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S47A 2	Amp
5988	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S47D 2	Amp
5989	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S66A 2	Amp
5990	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S66D 2	Amp
5991	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 T106A 2	Amp
5992	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 T106D 2	Amp
5993	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S122A 1	Amp
5994	EC	XL1blue	pQE70 RCAR11 S122D 1	Amp
5995	EC	XL1blue	pQE70 OST1 Y182C	Amp
5996	EC	XL1blue	pQE70 OST1 Y182F	Amp
5997	EC	XL1blue	pQE70 OST1 Y182T-2	Amp
6382	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 31 A	Amp
6383	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 31 A	Amp

ANHANG

6384	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 106 A	Amp
6385	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 106 A	Amp
6386	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 16 A	Amp
6387	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 16 A	Amp
6388	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 122 A	Amp
6389	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 122 A	Amp
6390	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 47 A	Amp
6391	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 47 A	Amp
6392	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 66 A	Amp
6393	EC	xl1blue	pSK Ascl 35S RCAR11 66 A	Amp
6877	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 S95D	Amp
6878	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 S108D	Amp
6879	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 S116D	Amp
6880	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 T123D	Amp
6881	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 T138D/140D	Amp
6882	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 T12A	Amp
6883	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 S95A	Amp
6884	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 S108A	Amp
6885	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 S116A	Amp
6886	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 T123A	Amp
6887	EC	DH5a	pSK35S RCAR9 T138A/140A	Amp
6888	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S25D	Amp
6889	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S32D	Amp
6890	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S86D/S88D	Amp
6891	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S99D	Amp
6892	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S107D	Amp
6893	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S113D	Amp
6894	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S129D/S131D	Amp
6895	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S25A	Amp
6896	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S32A	Amp
6897	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S86A/S88A	Amp
6898	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S99A	Amp
6899	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S107A	Amp
6900	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S113A	Amp
6901	EC	DH5a	pSK35S RCAR10 S129A/S131A	Amp
6902	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T3D	Amp
6903	EC	DH5a	pSK35S ABF1 S28D	Amp
6904	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T33D	Amp
6905	EC	DH5a	pSK35S ABF1 S50D	Amp
6906	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T135D	Amp
6907	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T242D	Amp
6908	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T3A	Amp
6909	EC	DH5a	pSK35S ABF1 S28A	Amp
6910	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T33A	Amp
6911	EC	DH5a	pSK35S ABF1 S50A	Amp

ANHANG

6912	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T135A	Amp
6913	EC	DH5a	pSK35S ABF1 T242A	Amp
6921	EC	Rosetta pLys	pET24b gca2fl	Cam/Kan
6922	EC	Rosetta pLys	pET24b gca2vk	Cam/Kan
6923	EC	Rosetta pLys	pET24b CPK23fl	Cam/Kan
6924	EC	Rosetta pLys	pET24b CPK23vk	Cam/Kan
6925	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 ΔEF1	Cam/Kan
6926	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 ΔEF2	Cam/Kan
6927	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 ΔEF3	Cam/Kan
6928	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 ΔEF4	Cam/Kan
6929	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 EF1 zu 21	Cam/Kan
6930	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 EF3 zu 21	Cam/Kan
6931	EC	Rosetta pLys	pET24B gca2 EF4 zu 21	Cam/Kan
6932	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 ΔEF1	Cam/Kan
6933	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 ΔEF2	Cam/Kan
6934	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 ΔEF3	Cam/Kan
6935	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 ΔEF4	Cam/Kan
6936	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 EF1 zu 21	Cam/Kan
6937	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 EF3 zu 21	Cam/Kan
6938	EC	Rosetta pLys	pET24B CPK23 EF4 zu 21	Cam/Kan
6939	EC	Rosetta pLys	pGEX6P1 ABF1	Cam/Kan
6940	EC	Rosetta pLys	pGEX6P1 ABF2	Cam/Kan
6941	EC	Rosetta pLys	pGEX6P1 ABF3	Cam/Kan
6942	EC	Rosetta pLys	pGEX6P1 ABF4	Cam/Kan
6943	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S4D	Amp
6944	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S26D	Amp
6945	EC	DH5a	pSK35S ABF2 T31D	Amp
6946	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S45D	Amp
6947	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S94D	Amp
6948	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S119D	Amp
6949	EC	DH5a	pSK35S ABF2 T135D	Amp
6950	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S4A	Amp
6951	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S26A	Amp
6952	EC	DH5a	pSK35S ABF2 T31A	Amp
6953	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S45A	Amp
6954	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S94A	Amp
6955	EC	DH5a	pSK35S ABF2 S119A	Amp
6956	EC	DH5a	pSK35S ABF2 T135A	Amp
6957	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S3D	Amp
6958	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S32D	Amp
6959	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S55D	Amp
6960	EC	DH5a	pSK35S ABF3 T169D	Amp
6961	EC	DH5a	pSK35S ABF3 T277D/T278D	Amp
6962	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S3A	Amp
6963	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S32A	Amp

ANHANG

6964	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S55A	Amp
6965	EC	DH5a	pSK35S ABF3 S125A/T128A	Amp
6966	EC	DH5a	pSK35S ABF3 T169D	Amp
6967	EC	DH5a	pSK35S ABF3 T277D/T278D	Amp
6998	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 16D/31D	Amp
6999	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 47D/66D	Amp
7000	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 106D/122D	Amp
7001	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 16A/31A	Amp
7002	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 47A/66A	Amp
7003	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 106A/122A	Amp
7004	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 16A/31A/47A	Amp
7005	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 16A/31A/47D	Amp
7006	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 16D/31D/66A	Amp
7007	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 16D/31D/66D	Amp
7008	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 47A/106A/122A	Amp
7009	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 47D/106D/122A	Amp
7010	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 66A/106A/122D	Amp
7011	EC	DH5a	pQE70 RCAR11 66D/106D/122A	Amp
7024	EC	DH5a	pGEX6P1 ABI5	Amp
7025	EC	DH5a	pGEX6P1 SlaC N-Terminus	Amp
7026	EC	DH5a	pGEX6P1 SlaH N-Terminus	Amp
7027	EC	DH5a	pGEX6P1 GCA2 fl	Amp
7028	EC	DH5a	pGEX6P1 GCA2 vk	Amp
7029	EC	DH5a	pGEX6P1 CPK23 fl	Amp
7030	EC	DH5a	pGEX6P1 CPK23 vk	Amp
7031	EC	DH5a	pGEX6P1 GCA2 fl tk	Amp
7032	EC	DH5a	pGEX6P1 CPK23 fl tk	Amp
7047	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC gca2 fl fl	Amp
7048	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC gca2 fl vk	Amp
7049	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC gca2 vk d14	Amp
7050	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC gca2 vk d58	Amp
7051	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC gca2 vk d64	Amp
7052	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC CPK23 fl fl	Amp
7053	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC CPK23 fl vk	Amp
7054	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC CPK23 vk d32	Amp
7055	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC CPK23 vk d58	Amp
7056	EC	DH5a	pSK 35S Ascl HSC CPK23 vk d64	Amp
7057	EC	DH5a	pGEX6P1 empty	Amp

6.4 Verwendete Oligonukleotide

#	Zweck	Gen	Name	Nukleotidsequenz
2067	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T3D forward	ATG GGT GAT CAC ATT GAT ATC AAC AAC TTA GGC
2068	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T3D reverse	GCC TAA GTT GTT GAT ATC AAT GTG ATC ACC CAT
2069	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S28D forward	AGG CAG TCT GAC TTA TAT TCC TTA ACG TTT GAT
2070	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S28D reverse	TAA GGA ATA TAA GTC AGA CTG CCT CGC CAA TGG
2071	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T33D forward	TAT TCC TTA GAC TTT GAT GAG CTT CAG AGC ACA
2072	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T33D reverse	AAG CTC ATC AAA GTC TAA GGA ATA TAA CGA AGA
2073	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S50D forward	GAT TTT GGG GAT ATG AAT ATG GAT GAG TTA CTC
2074	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S50D reverse	ATC CAT ATT CAT ATC CCC AAA ATC TTT CCC CGG
2075	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T135D forward	AGG CAA CAG GAT TTA GGG GAA ATG ACT CTG GAA
2076	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T135D reverse	CAT TTC CCC TAA ATC CTG TTG CCT CTC AAG CGC
2077	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T242D forward	GCG AAT GTA GAC TTT GCG GCG CCT GTA AAT ATG
2078	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T242D reverse	AGG CGC CGC AAA GTC TAC ATT CGC TTG TTT TGG
2079	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T3A forward	ATG GGT GCT CAC ATT GAT ATC AAC AAC TTA GGC
2080	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T3A reverse	GCC TAA GTT GTT GAT ATC AAT GTG AGC ACC CAT
2081	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S28A forward	AGG CAG TCT GCG TTA TAT TCC TTA ACG TTT GAT
2082	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S28A reverse	TAA GGA ATA TAA CGC AGA CTG CCT CGC CAA TGG
2083	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T33A forward	TAT TCC TTA GCG TTT GAT GAG CTT CAG AGC ACA
2084	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T33A reverse	AAG CTC ATC AAA CGC TAA GGA ATA TAA CGA AGA
2085	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S50A forward	GAT TTT GGG GCT ATG AAT ATG GAT GAG TTA CTC
2086	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	S50A reverse	ATC CAT ATT CAT AGC CCC AAA ATC TTT CCC CGG
2087	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T135A forward	AGG CAA CAG GCT TTA GGG GAA ATG ACT CTG GAA
2088	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T135A reverse	CAT TTC CCC TAA AGC CTG TTG CCT CTC AAG CGC
2089	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T242A forward	GCG AAT GTA GCA TTT GCG GCG CCT GTA AAT ATG
2090	SDM	pSK ABF1 Templat#3598	T242A reverse	AGG CGC CGC AAA TGC TAC ATT CGC TTG TTT TGG
2091	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S4D forward	ATG GAT GGT GAT ATG AAT TTG GGG AAT GAG CCA
2092	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S4D reverse	TGG CTC ATT CCC CAA ATT CAT ATC ACC ATC CAT
2093	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S26D forward	AGA CAA GGT GAC ATA TAC TCG TTG ACG TTT GAT
2094	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S26D reverse	CAA CGA GTA TAT GTC ACC TTG TCT AGT CAA CCC
2095	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T31D forward	TAC TCG TTG GAC TTT GAT GAG TTT CAG AGC AGT
2096	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T31D reverse	AAA CTC ATC AAA GTC CAA CGA GTA TAT CGA ACC
2097	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S45D forward	GAT TTT GGG GAC ATG AAC ATG GAT GAG TTG TTA
2098	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S45D reverse	ATC CAT GTT CAT GTC CCC AAA ATC TTT CCC TAC
2099	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S94D forward	CGA ACG CTT GAT CAG AAG ACG GTT GAT CAA GTT
2100	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S94D reverse	AAC CGT CTT CTG ATC AAG CGT TCG AGG CAG AGT
2101	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S119D forward	AGT AAC TTG GAT CAG GTG GCT CAG GCT CAG AGT
2102	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S119D reverse	CTG AGC CAC CTG ATC CAA GTT ACT TCC CCC TAC
2103	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T135D forward	AGG CAG CAA GAC TTA GGT GAA GTA ACT TTG GAG
2104	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T135D reverse	TAC TTC ACC TAA GTC TTG CTG CCT CTG ACT CTG
2105	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S4A forward	ATG GAT GGT GCT ATG AAT TTG GGG AAT GAG CCA
2106	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S4A reverse	TGG CTC ATT CCC CAA ATT CAT AGC ACC ATC CAT
2107	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S26A forward	AGA CAA GGT GCG ATA TAC TCG TTG ACG TTT GAT
2108	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S26A reverse	CAA CGA GTA TAT CGC ACC TTG TCT AGT CAA CCC
2109	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T31A forward	TAC TCG TTG GCG TTT GAT GAG TTT CAG AGC AGT
2110	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T31A reverse	AAA CTC ATC AAA CGC CAA CGA GTA TAT CGA ACC
2111	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S45A forward	GAT TTT GGG GCA ATG AAC ATG GAT GAG TTG TTA

ANHANG

2112	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S45A reverse	ATC CAT GTT CAT TGC CCC AAA ATC TTT CCC TAC
2113	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S94A forward	CGA ACG CTT GCT CAG AAG ACG GTT GAT CAA GTT
2114	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S94A reverse	AAC CGT CTT CTG AGC AAG CGT TCG AGG CAG AGT
2115	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S119A forward	AGT AAC TTG GCT CAG GTG GCT CAG GCT CAG AGT
2116	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	S119A reverse	CTG AGC CAC CTG AGC CAA GTT ACT TCC CCC TAC
2117	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T135A forward	AGG CAG CAA GCA TTA GGT GAA GTA ACT TTG GAG
2118	SDM	pSK ABF2 Templat#4502	T135A reverse	TAC TTC ACC TAA TGC TTG CTG CCT CTG ACT CTG
2119	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S3D forward	ATG GGG GAT AGA TTA AAC TTC AAG AGC TTT GTT
2120	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S3D reverse	AAC AAA GCT CTT GAA GTT TAA TCT ATC CCC CAT
2121	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S32D forward	AGG CAG AAC GAT GTG TTC TCG TTA ACC TTT GAT
2122	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S32D reverse	TAA CGA GAA CAC ATC GTT CTG CCT AGT CAA TGG
2123	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S55D forward	GAT TTT GGG GAT ATG AAC ATG GAT GAG CTC TTG
2124	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S55D reverse	ATC CAT GTT CAT ATC CCC AAA ATC TTT CCC AAT
2125	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S125D/T128D for.	CAA GGT GAT CTT GAC TTG CCT CGG ACG ATT AGT
2126	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S125D/T128D rev.	CGT CCG AGG CAA GTC AAG ATC ACC TTG TCT CTG
2127	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T169D forward	AGG CAA CAA GAC CTG GGA GAG ATG ACT TTG GAG
2128	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T169D reverse	CAT CTC TCC CAG GTC TTG TTG CCT CTG CGG AAT
2129	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T277D/T278D for.	CCC AAA CAG GAC GAT ATA GCA TTT TCC AAC ACT
2130	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T277D/T278D rev.	GGA AAA TGC TAT ATC GTC CTG TTT GGG AAA AGG
2131	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S3A forward	ATG GGG GCT AGA TTA AAC TTC AAG AGC TTT GTT
2132	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S3A reverse	AAC AAA GCT CTT GAA GTT TAA TCT AGC CCC CAT
2133	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S32A forward	AGG CAG AAC GCT GTG TTC TCG TTA ACC TTT GAT
2134	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S32A reverse	TAA CGA GAA CAC AGC GTT CTG CCT AGT CAA TGG
2135	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S55A forward	GAT TTT GGG GCT ATG AAC ATG GAT GAG CTC TTG
2136	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S55A reverse	ATC CAT GTT CAT AGC CCC AAA ATC TTT CCC AAT
2137	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S125A/T128A for.	CAA GGT GCA CTT GCC TTG CCT CGG ACG ATT AGT
2138	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	S125A/T128A rev.	CGT CCG AGG CAA GGC AAG TGC ACC TTG TCT CTG
2139	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T169A forward	AGG CAA CAA GCG CTG GGA GAG ATG ACT TTG GAG
2140	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T169A reverse	CAT CTC TCC CAG CGC TTG TTG CCT CTG CGG AAT
2141	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T277A/T278A for.	CCC AAA CAG GCC GCT ATA GCA TTT TCC AAC ACT
2142	SDM	pSK ABF3 Templat#5230	T277A/T278A rev.	GGA AAA TGC TAT AGC GGC CTG TTT GGG AAA AGG
2143	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T12D Forward	AGA TCC TCC GAC GCC GCA GAA GCA GCC AAC GCC
2144	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T12D Reverse	TGC TTC TGC GGC GTC GGA GGA TCT CTG AAA CTG
2145	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S95D forward	TTC GTG AAA GAC TGC CAC GTG GTT ATC GGA GAC
2146	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S95D reverse	AAC CAC GTG GCA GTC TTT CAC GAA GTG TTT GTA
2147	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S108D forward	GAG GTT GGG GAC GTG AGA GAG GTC AGA GTC GTC
2148	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S108D reverse	GAC CTC TCT CAC GTC CCC AAC CTC TCG ACC GTC
2149	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S116D forward	AGA GTC GTC GAT GGT CTC CCC GCG GCG TTT AGC
2150	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S116D reverse	CGC GGG GAG ACC ATC GAC GAC TCT GAC CTC TCT
2151	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T123D forward	GCG GCG TTT GAC TTA GAG CGG CTT GAG ATC ATG
2152	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T123D reverse	AAG CCG CTC TAA GTC AAA CGC CGC GGG GAG ACC
2153	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S138D/S140D for.	CAC GTC ATC GAT TTC GAC GTC GTT GGT GGG GAC
2154	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S138D/S148D rev.	ACC AAC GAC GTC GAA ATC GAT GAC GTG GCG ATC
2155	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T12A Forward	AGA TCC TCC GCC GCC GCA GAA GCA GCC AAC GCC
2156	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T12A Reverse	TGC TTC TGC GGC GGC GGA GGA TCT CTG AAA CTG
2157	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S95A forward	TTC GTG AAA GCC TGC CAC GTG GTT ATC GGA GAC
2158	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S95A reverse	AAC CAC GTG GCA GGC TTT CAC GAA GTG TTT GTA

ANHANG

2159	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S108A forward	GAG GTT GGG GCG GTG AGA GAG GTC AGA GTC GTC
2160	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S108A reverse	GAC CTC TCT CAC CGC CCC AAC CTC TCG ACC GTC
2161	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S116A forward	AGA GTC GTC GCT GGT CTC CCC GCG GCG TTT AGC
2162	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S116A reverse	CGC GGG GAG ACC AGC GAC GAC TCT GAC CTC TCT
2163	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T123A forward	GCG GCG TTT GCC TTA GAG CGG CTT GAG ATC ATG
2164	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	T123A reverse	AAG CCG CTC TAA GGC AAA CGC CGC GGG GAG ACC
2165	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S138A/S140A for.	CAC GTC ATC GCT TTC GCC GTC GTT GGT GGG GAC
2166	SDM	pSK RCAR9 Templat#4392	S138A/S148A rev.	ACC AAC GAC GGC GAA AGC GAT GAC GTG GCG ATC
2167	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S25D forward	ATG ATC GCG GAC TTT CAA AAA CGT TTT CCT TCT
2168	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S25D reverse	ACG TTT TTG AAA GTC CGC GAT CAT CAT CGG AAT
2169	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S32D forward	CGT TTT CCT GAT CTC TCA CGC GAC TCC ACG GCC
2170	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S32D reverse	GTC GCG TGA GAG ATC AGG AAA ACG TTT TTG AAA
2171	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S86D/S88D forward	TTT CTC AAA GAC TGT GAC GTC ATC GGC GGA GAC
2172	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S86D/S88D reverse	GCC GAT GAC GTC ACA GTC TTT GAG AAA GTG TTT
2173	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S99D forward	AAC GTT GGT GAC CTC CGT CAA GTC CAC GTC GTC
2174	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S99D reverse	GAC TTG ACG GAG GTC ACC AAC GTT ATC GCC GTC
2175	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S107D forward	CAC GTC GTC GAT GGT CTC CCC GCC GCT AGC TCC
2176	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S107D reverse	GGC GGG GAG ACC ATC GAC GAC GTG GAC TTG ACG
2177	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S113D forward	CCC GCC GCT GAC TCC ACC GAG AGA CTC GAT ATC
2178	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S113D reverse	TCT CTC GGT GGA GTC AGC GGC GGG GAG ACC AGA
2179	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S129D/S131D for.	CAC GTC ATC GAC TTC GAC GTT GTT GGT GGT GAC
2180	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S129D/S131D rev.	ACC AAC AAC GTC GAA GTC GAT GAC GTG GCG TTC
2181	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S25A forward	ATG ATC GCG GCG TTT CAA AAA CGT TTT CCT TCT
2182	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S25A reverse	ACG TTT TTG AAA CGC CGC GAT CAT CAT CGG AAT
2183	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S32A forward	CGT TTT CCT GCT CTC TCA CGC GAC TCC ACG GCC
2184	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S32A reverse	GTC GCG TGA GAG AGC AGG AAA ACG TTT TTG AAA
2185	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S86A/S88A forward	TTT CTC AAA GCC TGT GCC GTC ATC GGC GGA GAC
2186	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S86A/S88A reverse	GCC GAT GAC GGC ACA GGC TTT GAG AAA GTG TTT
2187	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S99A forward	AAC GTT GGT GCC CTC CGT CAA GTC CAC GTC GTC
2188	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S99A reverse	GAC TTG ACG GAG GGC ACC AAC GTT ATC GCC GTC
2189	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S107A forward	CAC GTC GTC GCT GGT CTC CCC GCC GCT AGC TCC
2190	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S107A reverse	GGC GGG GAG ACC AGC GAC GAC GTG GAC TTG ACG
2191	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S113A forward	CCC GCC GCT GCC TCC ACC GAG AGA CTC GAT ATC
2192	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S113A reverse	TCT CTC GGT GGA GGC AGC GGC GGG GAG ACC AGA
2193	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S129A/S131A for.	CAC GTC ATC GCC TTC GCC GTT GTT GGT GGT GAC
2194	SDM	pSK RCAR10 Templat#4393	S129A/S131A rev.	ACC AAC AAC GGC GAA GGC GAT GAC GTG GCG TTC
2195	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S16D forward	CTA AAA AAC GAC AT C GCC GAG TTC CAC ACA TAC
2196	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S16D reverse	GAA CTC GGC GAT GTC GTT TTT TAG TTC CGA TCG
2197	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S31D forward	GGA AGC TGT GAC TCA CTC CAC GCG CAA CGA ATC
2198	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S31D reverse	CGC GTG GAG TGA GTC ACA GCT TCC TGG ATC GAG
2199	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S47D forward	CTC GTC TGG GAC ATC GTA CGA CGA TTC GAC AAA
2200	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S47D reverse	TCG TCG TAC GAT GTC CCA GAC GAG TTC CGG AGG
2201	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S66D forward	AAA TCC TGC GAC GTC GAA CAA AAC TTC GAG ATG
2202	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S66D reverse	GTT TTG TTC GAC GTC GCA GGA TTT GAT GAA GTG
2203	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S106D forward	CGG AGA GTT GAC GGA TTC AGT ATC ATC GGA GGC
2204	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S106D reverse	GAT ACT GAA TCC GTC AAC TCT CCG TTC GTC GTC
2205	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S122D forward	AAT TAC AAA GAC GTT ACG ACG GTG CAT CGG TTC
2206	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S122D reverse	CAC CGT CGT AAC GTC TTT GTA ATT CGT CAG CCT

ANHANG

2207	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S16A forward	CTA AAA AAC GCA AT C GCC GAG TTC CAC ACA TAC
2208	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S16A reverse	GAA CTC GGC GAT TGC GTT TTT TAG TTC CGA TCG
2209	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S31A forward	GGA AGC TGT GCA TCA CTC CAC GCG CAA CGA ATC
2210	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S31A reverse	CGC GTG GAG TGA TGC ACA GCT TCC TGG ATC GAG
2211	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S47A forward	CTC GTC TGG GCA ATC GTA CGA CGA TTC GAC AAA
2212	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S47A reverse	TCG TCG TAC GAT TGC CCA GAC GAG TTC CGG AGG
2213	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S66A forward	AAA TCC TGC GCC GTC GAA CAA AAC TTC GAG ATG
2214	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S66A reverse	GTT TTG TTC GAC GGC GCA GGA TTT GAT GAA GTG
2215	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S106A forward	CGG AGA GTT GCC GGA TTC AGT ATC ATC GGA GGC
2216	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S106A reverse	GAT ACT GAA TCC GGC AAC TCT CCG TTC GTC GTC
2217	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S122A forward	AAT TAC AAA GCC GTT ACG ACG GTG CAT CGG TTC
2218	SDM	pSK RCAR11 Templat#4099	S122A reverse	CAC CGT CGT AAC GGC TTT GTA ATT CGT CAG CCT
2219	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF1 DA forward	TTT GCG AAT ATG GCT ACC AAT AGA AGC GGG ACA ATC
2220	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF1 DA reverse	TCT ATT GGT AGC CAT ATT CGC AAA CAA GGT TTT AAG
2221	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF1 QK forward	ATC ACT TAT GAA AAA CTC CAA ACT GGG CTA AGT AGA
2222	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF1 QK reverse	AGT TTG GAG TTT TTC ATA AGT GAT TGT CCC GCT TCT
2223	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF2 DA forward	GTT GAA GCG TCT GCT GTG GAT GGT AAT GGA ACA ATT
2224	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF2 DA reverse	ACC ATC CAC AGC AGA CGC TTC AAC GAG TTG CTG AAC
2225	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF2 QK forward	ATT GAC TAC TAT AAG TTT ATC TCT GCG ACA ATG CAT
2226	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF2 QK reverse	AGA GAT AAA CTT ATA GTA GTC AAT TGT TCC ATT ACC
2227	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF3 DA forward	TTC CAA CAC TTA GCT AAA GAC AAA AAT GGG CAC ATA
2228	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF3 DA reverse	TTT GTC TTT AGC TAA GTG TTG GAA TGC TTT GTG TAC
2229	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF3 QK forward	ATA ACT AGG GAT AAG TTG GAA AGT GCC ATG AAG GAA
2230	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF3 QK reverse	ACT TTC CAA CTT ATC CCT AGT TAT GTG CCC ATT TTT
2231	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF4 DA forward	ATA TCC GAA GTT GCC ACC GAC AAT GAT GGA AAA ATA
2232	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF4 DA reverse	ATT GTC GGT GGC AAC TTC GGA TAT AAC TTC TTT GAT
2233	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF4 QK forward	ATA AAC TTT GAG AAA TTT CGT GCG ATG ATG AGA TGT
2234	SDM	pQE70 CPK23 Ler/Col	EF4 QK reverse	CGC ACG AAA TTT CTC AAA GTT TAT TTT TCC ATC ATT
2235	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF1 DA forward	TTT GCG AAT ATA GCT ACC GAC AAA AGC GGG ACA ATC
2236	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF1 DA reverse	TTT GTC GGT AGC TAT ATT CGC AAA CAT GGT TTT AAG
2237	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF1 QK forward	ATC ACT TAT GAA AAA CTC AAA ACT GGG CTA ACT AGA
2238	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF1 QK reverse	AGT TTT GAG TTT TTC ATA AGT GAT TGT CCC GCT TTT
2239	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF2 DA forward	ATG GAA GCC GCT GCC GTC GAT GGT AAT GGA ACA ATC
2240	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF2 DA reverse	ACC ATC GAC GGC AGC GGC TTC CAT GAG TTG CTT AAC
2241	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF2 QK forward	ATC GAC TAC TAC AAG TTT ATC TCT GCG ACA ATG CAT
2242	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF2 QK reverse	AGA GAT AAA CTT GTA GTA GTC GAT TGT TCC ATT ACC
2243	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF3 DA forward	TTC CAA CAC TTT GCT AAA GAC AAC AGC GGG CAC ATA
2244	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF3 DA reverse	GTT GTC TTT AGC AAA GTG TTG GAA TGC TTT GTA TAC
2245	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF3 QK forward	ATA ACT AGA GAT AAG TTG GAA AGT GCC ATG AAG GAA
2246	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF3 QK reverse	ACT TTC CAA CTT ATC TCT AGT TAT GTG CCC GCT GTT
2247	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF4 DA forward	ATA TCC GAA GTT GCT ACC GAC AAT GAT GGA AGA ATA
2248	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF4 DA reverse	ATT GTC GGT AGC AAC TTC GGA TAT AAC TTC TTT GAT
2249	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF4 QK forward	ATA AAC TTT GAA AAA TTT TGC GCG ATG ATG AGA AGT
2250	SDM	pQE70 CPK21 Ler	EF4 QK reverse	CGC GCA AAA TTT TTC AAA GTT TAT TCT TCC ATC ATT
2251	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF1 ND RK forward	AAT ATG GAT ACC GAT AAA AGC GGG ACA ATC ACT TAT GAA
2252	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF1 ND RK reverse	TGT CCC GCT TTT ATC GGT ATC CAT ATT CGC AAA CAA GGT

ANHANG

2253	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF1 QE forward	ATC ACT TAT GAA GAA CTC CAA ACT GGG CTA AGT AGA
2254	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF1 QE reverse	AGT TTG GAG TTC TTC ATA AGT GAT TGT CCC GCT TCT
2255	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF3 KN NS forward	TTA GAT AAA GAC AAC AGT GGG CAC ATA ACT AGG GAT GAG
2256	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF3 KN NS reverse	TAT GTG CCC ACT GTT GTC TTT ATC TAA GTG TTG GAA TGC
2257	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF4 KR forward	GAC AAT GAT GGA AGA ATA AAC TTT GAG GAA TTT CGT
2258	SDM	pQE70 CPK23 CPK21EFHand	EF4 KR reverse	AAA GTT TAT TCT TCC ATC ATT GTC GGT GTC AAC TTC
2259	cloning	pGEX6P1 ABF1	BamHI Sall forward	CGC GGATCC ATG GGT ACT CAC ATT GAT
2260	cloning	pGEX6P1 ABF1	BamH Sall reverse	ACGC GTCGACG CCT TCT TAC CAC GGA CCG GTA
2261	cloning	pGEX6P1 ABF2	BamHI EcoRI forward	CGC GGATCC ATG GAT GGT AGT ATG AAT
2262	cloning	pGEX6P1 ABF2	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC CCA AGG TCC CGA CTC
2263	cloning	pGEX6P1 ABF3	BamHI Sall forward	CGC GGATCC ATG GGG TCT AGA TTA AAC
2264	cloning	pGEX6P1 ABF3	BamH Sall reverse	ACGC GTCGACG CCA GGG ACC CGT CAA TGT CCT
2265	cloning	pGEX6P1 ABF4	BamHI EcoRI forward	CGC GGATCC ATG GGA ACT CAC ATC AAT
2266	cloning	pGEX6P1 ABF4	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC CCA TGG TCC GGT TAA
2267	cloning	pGEX6P1 SLAH3 N-Terminus	BamHI EcoRI forward	CGC GGATCC ATG GAG GAG AAA CCA AAC TAT
2268	cloning	pGEX6P1 SLAH3 N-Terminus	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC CGG CCA CTT TTT ATC ATT TGG
2269	cloning	pGEX6P1 SLAC1 N-Terminus	BamHI Sall forward	CGC GGATCC ATG GAG AGG AAA CAG TCA AAT
2270	cloning	pGEX6P1 SLAC1 N-Terminus	BamH Sall reverse	ACGC GTCGACG GAA CCT TAG GAG AAA CGG CCA
2271	cloning	pGEX6P1 GCA2 Ler	BamHI EcoRI forward	CGC GGATCC ATG CTA GGT TGC TTC AGC AGT
2272	cloning	pGEX6P1 GCA2 Ler	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC GTG GAA TGG ATA CTG TTT CCC
2273	cloning	pGEX6P1 CPK23 Col	BamHI EcoRI forward	CGC GGATCC ATG GGT TGT TTC AGC AGT AAA
2274	cloning	pGEX6P1 CPK23 Col	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC GTG GAA TGG ATA CTG TTT CCC
2275	cloning	pGEX6P1 ABI5	BamHI EcoRI forward	CGC GGATCC ATG GTA ACT AGA GAA ACG AAG
2276	cloning	pGEX6P1 ABI5	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC GAG TGG ACA ACT CGG GTT CCT
2277	cloning	pGEX6P1 CPK23-vk Ler/Col	BamHI EcoRI reverse	CCG GAATTC GAA TTG CTT CAT ACG TGA TAA CAC
2278	cloning	pET24B ABF1	SpeI Sall forward	GG ACTAGT ATG GGT ACT CAC ATT GAT
2279	cloning	pET24B ABF1	SpeI Sall reverse	ACGC GTCGACG CCT TCT TAC CAC GGA CCG GTA
2280	cloning	pET24B ABF2	SpeI EcoRI forward	GG ACTAGT ATG GAT GGT AGT ATG AAT
2281	cloning	pET24B ABF2	SpeI EcoRI reverse	CCG GAATTC CCA AGG TCC CGA CTC
2282	cloning	pET24B ABF3	SpeI XhoI forward	CGC GGATCC ATG GGG TCT AGA TTA AAC
2283	cloning	pET24B ABF3	SpeI XhoI reverse	CCG CTCGAG CCA GGG ACC CGT CAA TGT CCT
2284	cloning	pET24B ABF4	SpeI EcoRI forward	GG ACTAGT ATG GGA ACT CAC ATC AAT
2285	cloning	pET24B ABF4	SpeI EcoRI reverse	CCG GAATTC CCA TGG TCC GGT TAA
2286	cloning	pET24B SLAH3 N-Terminus	SpeI EcoRI forward	GG ACTAGT ATG GAG GAG AAA CCA AAC TAT
2287	cloning	pET24B SLAH3 N-Terminus	SpeI EcoRI reverse	CCG GAATTC CGG CCA CTT TTT ATC ATT TGG
2288	cloning	pET24B SLAC1 N-Terminus	SpeI Sall forward	GG ACTAGT ATG GAG AGG AAA CAG TCA AAT
2289	cloning	pET24B SLAC1 N-Terminus	SpeI Sall reverse	ACGC GTCGACG GAA CCT TAG GAG AAA CGG CCA
2290	cloning	pET24B GCA2 Ler	SpeI EcoRI forward	GG ACTAGT ATG CTA GGT TGC TTC AGC AGT
2291	cloning	pET24B GCA2 Ler	SpeI EcoRI reverse	CCG GAATTC GTG GAA TGG ATA CTG TTT CCC
2292	cloning	pET24B CPK23 Col	SpeI EcoRI forward	GG ACTAGT ATG GGT TGT TTC AGC AGT AAA
2293	cloning	pET24B CPK23 Col	SpeI EcoRI reverse	CCG GAATTC GTG GAA TGG ATA CTG TTT CCC
2294	cloning	pET24B ABI5	SpeI EcoRI forward	GG ACTAGT ATG GTA ACT AGA GAA ACG AAG
2295	cloning	pET24B ABI5	SpeI EcoRI reverse	CCG GAATTC GAG TGG ACA ACT CGG GTT CCT
2296	SDM	pGEX6P1 ABF3	ABF3 silent mut for.	ACG GTG GGG ACG AGT CTT CCA TTG ACT AGG CAG AAC TCT GT
2297	SDM	pGEX6P1 ABF3	ABF3 silent mut rev.	TGG AAG ACT CGT CCC CAC CGT TGG CTG CTG
2300	cloning	pQE70 SH3 Protein 1	SphI forward	GCGCGCATGCTA GAA GCT ATA AGA AAG CAA GCT GCG
2301	cloning	pQE70 SH3 Protein 1	BamHI reverse	GCGCGGATCC CTG TTG CTT GGA GTT TGA TTC CAC

ANHANG

2302	cloning	pQE70 SH3 Protein 2	SphI forward	GCGCGCATGCTA GAT GCA ATT AGA AAA CAA GCT AGC
2303	cloning	pQE70 SH3 Protein 2	BamHI reverse	GCGCGGATCC GAA AAC TTC GGA CAC TTT GCT AGC AAG
2304	cloning	pQE70 SH3 Protein 3	SphI forward	GCGCGCATGCTA GAT GCG TTT AGA AGA CAA GCG AGT
2305	cloning	pQE70 SH3 Protein 3	BglII reverse	GCGCAGATCT GTA AAC TTC AGC AGC AAA GTT GGT
2306	cloning	pQE70 ABF2	SphI forward	ACATGCATGC ATG GAT GGT AGT ATG AAT
2307	cloning	pQE70 ABF2	BamHI reverse	GCGCGGATCC CCA AGG TCC CGA CTC
2308	cloning	pQE70 ABF3	SphI forward	ACATGCATGC ATG GGG TCT AGA TTA AAC
2309	cloning	pQE70 ABF3	BamHI reverse	GCGCGGATCC CCA GGG ACC CGT CAA
2310	cloning	pQE70 ABF4	SphI forward	ACATGCATGC ATG GGA ACT CAC ATC AAT
2311	cloning	pQE70 ABF4	BamHI reverse	GCGCGGATCC CCA TGG TCC GGT TAA
2312	cloning	pQE70 SlaC	SphI forward	ACA TGC ATG CAT GGA GAG GAA ACA GTC AAA T
2313	cloning	pQE70 SlaC	BamHI reverse	CGC GGA TCC GAA CCT TAG GAG AAA CGG CCA
2314	cloning	pQE70 SlaH	EcoRI forward	CCG GAA TTC ATG GAG GAG AAA CCA AAC TAT
2315	cloning	pQE70 SlaH	BamHI reverse	CGC GGA TCC CGG CCA CTT TTT ATC ATT TGG
2316	cloning	pQE70 CPK23 Ler	delta 14 forward	TTG TAG CAT GCT AGG CGG CGA AAG AAC AAT TCC G
2317	cloning	pQE70 CPK23 Ler	delta 32 forward	TTG TAG CAT CAT GCT AGT CCC AAC TCC ATC GAC ACC C
2318	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	delta 58 forward	TTG TAG CAT GCT AGG TAA ACC CTT CCA AGA GAT C
2319	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	delta 64 forward	TTG TAG CAT GCT AAT CAG GAA ATT TTA CAG CTT G
2320	cloning	pQE70 CPK23 Col	delta 14 forward	TTG TAG CAT GCT AGG CGG AGA AAG ATC AAT TCC G
2321	cloning	pQE70 CPK23 Col	delta 32 forward	TTG TAG CAT GCT AGT CCC CGA TCA TCG TAA ACC T
2322	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	volle Länge reverse	TTG TAG CAT GCT AAT GGG TTG CTT CAG CAG TAA A
2323	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	verkürzt reverse	TTG TAG GAT CCG AAT TGC TTC ATA CGT GAT AA
2324	cloning	pQE70 CPK23 Ler	delta 14 forward	GCG GAT CCG GCG GCG AAA GAA CAA TTC CG
2325	cloning	pQE70 CPK23 Ler	delta 32 forward	GCG GAT CCG TCC CAA CTC CAT CGA CAC CC
2326	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	delta 58 forward	GCG GAT CCG GTA AAC CCT TCG AAG ACA TC
2327	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	delta 64 forward	GCG GAT CCA TCA GGA AAT TTT ACA GCT TGG GG
2328	cloning	pQE70 CPK23 Col	volle Länge forward	GCG GAT CCA TGG GTT GCT TCA GCA GTA AA
2329	cloning	pQE70 CPK23 Col	delta 14 forward	GCG GAT CCG GCG GAG AAA GAT CAA TTC CG
2330	cloning	pQE70 CPK23 Col	delta 32 forward	GCG GAT CCG TCC CCG ATC ATC GTA AAC CT
2331	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	volle Länge reverse	TTG TAG GAT CCG TGG AAT GGA TAC TGT TTC C
2332	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	verkürzt reverse	CGG AGC TCT TAG AAT TGC TTC ATA CCT GAT AA
2333	cloning	pQE70 CPK23 Ler/ Col	reverse	CGG AGC TCT TAG TGG AAT GGA TAC TGT TTC
2334	Sequencing	pET32a	forward	TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GCT GCT AAA TTC GAA CG
2335	Sequencing	pET32a	reverse	TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA AGC GGT TTC TTT CAT ACC
2336	Sequencing	pGEX6P1	forward	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG
2337	Sequencing	pGEX6P1	reverse	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG
2338	Sequencing	pGEX6P1	forward	TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GAT CTG GAA GTT CTG TTC
2339	Sequencing	pGEX6P1	reverse	TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CAA CGA TTT TGG AGG ATG GTC
2340	cloning	HA Strep	EcoRI forward	GTT CGA ATT CAT GTA TCC ATA CGA TGT TCC AGA TAA TG
2341	cloning	HA Strep	PstI forward	GTT CCT GCA GTA TCC ATA CGA TGT TCC AGA TTA TG
2342	cloning	HA Strep	NheI reverse	GTT CGC TAG CTT TTT CAA ATT GAG GAT GAG ACC
2343	cloning	HA Strep	SacI reverse	GTT CGA GCT CTT ATT TTT CAA ATT GAG GAT GAG ACC
2344	SDM	pQE70 gca2	tk forward	GTG ATT CAT CGA GCT CTC AAG CCT GAG AAT TTC TTG TTC
2345	SDM	pQE70 gca2	tk reverse	GAA CAA GAA ATT CTC AGG CTT GAG AGC TCG ATG AAT CAC
2346	SDM	pQE70 gca2	frameshift forward	AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA ACT AGG GGG TGC TTC AGC A
2347	SDM	pQE70 gca2	frameshift reverse	TTT CCG GTG TTT ACT GCT GAA GCA CCC CCT AGT TTT TTC GAA
2348	SDM	pQE70 gca2	reSDM T214C for.	CTT AAA GTA ACC GAT TTC GGG TTG TCC GCG TTC
2349	SDM	pQE70 gca2	reSDM T214C rev.	CAA CCC GAA ATC GGT TAC TTT AAG CAT TGC ATT

ANHANG

2350	SDM	pQE70 CPK23 Ler	1326 AC forward	TAC AAA TTA CAT CAC GAT GAG CAC GTA CAC AAA GCA
2351	SDM	pQE70 CPK23 Ler	1326 AC reverse	GTG CTC ATC GTG ATG TAA TTT GTA TCT ATG CAT TGT
2352	SDM	pQE70 CPK23 Col	1326 AC forward	TAC AAA TTA CAT CAA GAT GCG CAC GTA CAC AAA GCA
2353	SDM	pQE70 CPK23 Col	1326 AC reverse	GTG CTC ATC TTG ATG TAA TTT GTA TCT ATG CAT TGT
2354	cloning	pQE70 gca2	EcrRI forward	CGA GAA TTC AAA TTA CAT ATG AGA GGA TCG CAT
2355	cloning	pQE70 gca2	EcoRI forward fl	CGA GAA TTC TTA GTG GAA TGG ATA CTG GTT CCC
2356	cloning	pQE70 gca2	EcoRI forward vk	GCA GAA TTC TTA GAA TTG CTT CAT ACG TGA TAA
2357	cloning	GCA2	3UTR R Sall	GTT CGT CGA CCA ATC CTA CTG GTG TCA TAT CC
2358	SDM	pQE70 CPK23 Ler/ Col	Df362 AA forward	CGC GGA TCC AGT CTA TCC GAA GAA GAG ATC
2359	SDM	pQE70 CPK23 Ler/ Col	Df362 AA reverse	CGC GGA TCC GAG ATC AAA GGT CTT AAA ACC
2360	SDM	pQE70 OST1	Y182T forward	ACT CCT GCT ACC ATC GCT CCT GAG GTT TTA C
2361	SDM	pQE70 OST1	Y182T reverse	AGG AGC GAT GGT AGC AGG AGT TCC AAC AGT T
2362	cloning	pQE70 OST1-GFP	EcoRI forward	CCC GGA ATG GAT GGT GAG CAA GGT CGA G
2363	cloning	pQE70 OST1-GFP	SphI reverse	ACA TGC ATG CGC GCT GCC GCA GCG GCA GCG GCA GCT GCA GC

6.5 Detaillierte Aufführung der massenspektrometrischen Daten

Aufgeführt sind alle durchgeführten massenspektrometrischen Analysen in Form der Primärsequenzen der Proteine. Aufgrund eines Software-Fehlers konnte für einige Auswertungen keine bzw. nicht die genaue Sequenzabdeckung berechnet werden. In der Analyse detektierte Aminosäuren wurden in der Sequenz unterstrichen.

6.5.1 Massenspektrometrische Daten der untersuchten Proteinkinasen

A OST1 Autophosphorylierung – Sequenzabdeckung 68,3%

MLDRPAV**S**GP MDLPIMHD**S**D RYELVKDIG**S** GNFGVARLMR DKQ**S**NELVAV KYIERGEKID 60
 ENVKREI**I**NH RSLRHPNIVR FKEVILTPTH LAIVMEYASG GELFERICNA GRF**S**EDEARF 120
FFQQLISGV**S** YCHAMOVCHR DLKLENTLLD GSPAPRLKIC DFGY**S****K****S**SVL HS**Q****P****K****S****T**VG**T** 180
PAY**I**APEVLL KKEYDGKVAD VWSCGVTLV MLVGAYPFED PEEPKNFRKT IHRILNVOYA 240
IPD**Y**VHISPE CRHLISRIFV ADPAKR**I**SIP EIRNHEWFLK NLPADLMNDN TMTTQFDESD 300
 QPGQSIEEIM QIIAEATVPP AGTQNLNHYL TGSLDIDDDM EEDLESDLDD LDIDSSGEIV 360
 YAM 363

B OST1 phosphoryliert durch CPK23L – Sequenzabdeckung 73%

MLDRPAVSGP MDLPIMHDS RYELVKDIG**S** GNFGVARLMR DKQ**S**NELVAV KYIERGEKID 60
 ENVKREIINH RSLRHPNIVR FKEVILTPTH LAIVMEYASG GELFERICNA GRFSEDEARF 120
 FFQQLISGVS YCHAMOVCHR DLKLENTLLD **G**S**P**APRLKIC DFGYSKSSVL HS**Q****P****K****S****T**VG**T** 180
 PAYIAPEVLL KKEYDGKVAD VWSCGVTLV MLVGAYPFED PEEPKNFRKT IHRILNVOYA 240
 IPDYVHISPE CRHLISRIFV ADPAKR**I**SIP EIRNHEWFLK NLPADLMNDN TMTTQFDESD 300
 QPGQSIEEIM QIIAEATVPP AGTQNLNHYL TGSLDIDDDM EEDLES**D**LDLDD LDIDSSGEIV 360
 YAM 363

C OST1 phosphoryliert durch CPK23C – Sequenzabdeckung 71,4%

MLDRPAVSGP MDLPIMHD**S**D RYELVKDIG**S** GNFGVARLMR DKQ**S**NELVAV KYIERGEKID 60
 ENVKREIINH RSLRHPNIVR FKEVILTPTH LAIVMEYASG GELFERICNA GRFSEDEARF 120
 FFQQLISGVS YCHAMOVCHR DLKLENTLLD **G**S**P**APRLKIC DFGYSK**S**SVL HS**Q****P****K****S****T**VG**T** 180
 PAYIAPEVLL KKEYDGKVAD VWSCGVTLV MLVGAYPFED PEEPKNFRKT IHRILNVOYA 240
 IPDYVHISPE CRHLISRIFV ADPAKR**I**SIP EIRNHEWFLK NLPADLMNDN TMTTQFDESD 300
 QPGQSIEEIM QIIAEATVPP AGTQNLNHYL TGSLDIDDDM EEDLES**D**LDLDD LDIDSSGEIV 360
 YAM 363

A CPK23L Autophosphorylierung – Sequenzabdeckung 79,2%

MGCFSSKHRK TONDGGRTI PIIPVOTHIV DOVPTPSTPI SVRYPPETILG KGKALGILGK 60
PFEDIRKFYS LGKELGRGGL GITYMCKEIS TGNNYACKSI LKRKLISEOG REDVKTEIOI 120
MQHLFGQPNV VEIKGAYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVSV 180
VQICHLKGVI HRDLPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKVYQDV AGSPYYVAPE 240
VLRRSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEIGIFDE ILKCEIDFVR EPWPSISESA 300
KDLVKKMLTE DPKRRITAEQ VLEHPWIKGG EAPDKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKLLALK 360
VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEQLOTGLSR LRSRLSETEV QQLVEASDVD 420
GNGTIDYYEF ISATMHRYKL HQDEHVHKAF QHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

B CPK23L phosphoryliert durch GST-CPK23L – Sequenzabdeckung 69,8%

MGCFSSKHRK TONDGGRTI PIIPVQTHIV DQVTPSTPI SVRYPPETILG KGKALGILGK 60
 PFEDIRKFYS LGKELGRGGL GITYMCKEIS TGNNYACKSI LKRKLISEOG REDVKTEIOI 120
 MQHLFGQPNV VEIKGAYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVSV 180
 VQICHLKGVI HRDLPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKVYQDV AGSPYYVAPE 240
 VLRRSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEIGIFDE ILKCEIDFVR EPWPSISESA 300
 KDLVKKMLTE DPKRRITAEQ VLEHPWIKGG EAPDKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKLLALK 360
 VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEQLOTGLSR LRSRLSETEV QQLVEASDVD 420
 GNGTIDYYEF ISATMHRYKL HQDEHVHKAF QHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
 IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

C CPK23L phosphoryliert durch GST-CPK23C – Sequenzabdeckung 71,3%

MGCFSSKHRK TONDGGRTI PIIPVQTHIV DQVTPSTPI SVRYPPETILG KGKALGILGK 60
 PFEDIRKFYS LGKELGRGGL GITYMCKEIS TGNNYACKSI LKRKLISEOG REDVKTEIOI 120
 MQHLFGQPNV VEIKGAYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVSV 180
 VQICHLKGVI HRDLPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKVYQDV AGSPYYVAPE 240
 VLRRSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEIGIFDE ILKCEIDFVR EPWPSISESA 300
 KDLVKKMLTE DPKRRITAEQ VLEHPWIKGG EAPDKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKLLALK 360
 VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEQLOTGLSR LRSRLSETEV QQLVEASDVD 420
 GNGTIDYYEF ISATMHRYKL HQDEHVHKAF QHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
 IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

D CPK23L phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 83,2%

MGCFSSKHRK TONDGGRTI PIIPVQTHIV DQVTPSTPI SVRYPPETILG KGKALGILGK 60
 PFEDIRKFYS LGKELGRGGL GITYMCKEIS TGNNYACKSI LKRKLISEOG REDVKTEIOI 120
 MQHLFGQPNV VEIKGAYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVSV 180
 VQICHLKGVI HRDLPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKVYQDV AGSPYYVAPE 240
 VLRRSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEIGIFDE ILKCEIDFVR EPWPSISESA 300
 KDLVKKMLTE DPKRRITAEQ VLEHPWIKGG EAPDKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKLLALK 360
 VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEQLOTGLSR LRSRLSETEV QQLVEASDVD 420
 GNGTIDYYEF ISATMHRYKL HQDEHVHKAF QHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
 IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

A CPK23C Autophosphorylierung – Sequenzabdeckung 70,8%

MGCFSKHKR TQNDGGGERS IPIIPVQTHI VDOVPDHRKP QIPSPSIPIS VRDPETILGK 60
PFEDIRKFYS LGRELGRGGL GITYMCKEIG TGNIYACKSI LKRKLISELG REDVKTEIQI 120
MQHLSGQPNV VEIKGSYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVDV 180
VOICHLNGVI HRDLKPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKIYKDV VGSPYYVAPE 240
VLRQSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEEGVFVE ILKCKIDFVR EPWPSISDSA 300
KDLVEKMLTE DPKRRITAAO VLEHPWIKGG EAPEKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKKLALK 360
VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEOLQTGLSR LRSRLSETEV OOLVEASDVD 420
NGTIDYYEF ISATMHRYKL HHDEHVHKAF OHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

B CPK23C phosphoryliert durch GST-CPK23L – Sequenzabdeckung 13,5%

MGCFSKHKR TQNDGGGERS IPIIPVQTHI VDOVPDHRKP QIPSPSIPIS VRDPETILGK 60
 PFEDIRKFYS LGRELGRGGL GITYMCKEIG TGNIYACKSI LKRKLISELG REDVKTEIQI 120
 MQHLSGQPNV VEIKGSYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVDV 180
 VOICHLNGVI HRDLKPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKIYKDV VGSPYYVAPE 240
 VLRQSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEEGVFVE ILKCKIDFVR EPWPSISDSA 300
 KDLVEKMLTE DPKRRITAAQ VLEHPWIKGG EAPEKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKKLALK 360
 VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEOLQTGLSR LRSRLSETEV QOLVEASDVD 420
 NGTIDYYEF ISATMHRYKL HHDEHVHKAF OHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
 IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

C CPK23C phosphoryliert durch GST-CPK23C – Sequenzabdeckung 60,3%

MGCFSKHKR TQNDGGGERS IPIIPVQTHI VDOVPDHRKP QIPSPSIPIS VRDPETILGK 60
 PFEDIRKFYS LGRELGRGGL GITYMCKEIG TGNIYACKSI LKRKLISELG REDVKTEIQI 120
 MQHLSGQPNV VEIKGSYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVDV 180
 VOICHLNGVI HRDLKPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKIYKDV VGSPYYVAPE 240
 VLRQSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEEGVFVE ILKCKIDFVR EPWPSISDSA 300
 KDLVEKMLTE DPKRRITAAQ VLEHPWIKGG EAPEKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKKLALK 360
 VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEOLQTGLSR LRSRLSETEV QOLVEASDVD 420
 NGTIDYYEF ISATMHRYKL HHDEHVHKAF OHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
 IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

D CPK23C phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 11,7%

MGCFSKHKR TQNDGGGERS IPIIPVQTHI VDOVPDHRKP QIPSPSIPIS VRDPETILGK 60
 PFEDIRKFYS LGRELGRGGL GITYMCKEIG TGNIYACKSI LKRKLISELG REDVKTEIQI 120
 MQHLSGQPNV VEIKGSYEDR HSVHLMELC AGGELFDRII AQGHYSERAA AGTIKSIVDV 180
 VOICHLNGVI HRDLKPENFL FSSKEENAML KVTDFGLSAF IEEGKIYKDV VGSPYYVAPE 240
 VLRQSYGKEI DIWSAGVILY ILLCGVPPFW ADNEEGVFVE ILKCKIDFVR EPWPSISDSA 300
 KDLVEKMLTE DPKRRITAAQ VLEHPWIKGG EAPEKPIDST VLSRMKQFRA MNKLKKLALK 360
 VSAVSLSEEE IKGLKTLFAN MDTNRSGTIT YEOLQTGLSR LRSRLSETEV QOLVEASDVD 420
 NGTIDYYEF ISATMHRYKL HHDEHVHKAF OHLDKDKNGH ITRDELESAM KEYGMGDEAS 480
 IKEVISEVDT DNDGKINFEE FRAMMRCGTT QPKGKQYPFH 520

6.5.2 Massenspektrometrische Daten der untersuchten RCAR Proteine

A RCAR9 phosphoryliert durch CPK23L

MP**TS**IQF**QRS** **ST**A~~A~~E~~A~~A~~A~~NAT VRNYPHHHQK QVQK**V**SLTRG MADVPEHVEL SHTHV**V**GPSQ 60
 CFSVV**V**QDVE APVSTVWSIL SRFEHPQAYK HFVKS**S**CHVVI GDGREVGS**V**R EVRV**V**SGLPA 120
 AF**S**LERLEIM DDDR**H**VISFS VVG**G**DHRLMN YKSVTT**V**HES EEDSDGKKRT RVVESY**V**VDV 180
 PAGNDKEETC SFADTIVRCN LQSLAKLAEN TSKFS 215

B RCAR9 phosphoryliert durch CPK23C

MP**TS**IQF**QRS** **ST**A~~A~~E~~A~~A~~A~~NAT VRNYPHHHQK QVQK**V**SLTRG MADVPEHVEL SHTHV**V**GPSQ 60
 CFSVV**V**QDVE APVSTVWSIL SRFEHPQAYK HFVKS**S**CHVVI GDGREVGS**V**R EVRV**V**SGLPA 120
 AF**S**LERLEIM DDDR**H**VISFS VVG**G**DHRLMN YKSVTT**V**HES EEDSDGKKRT RVVESY**V**VDV 180
 PAGNDKEETC SFADTIVRCN LQSLAKLAEN TSKFS 215

C RCAR9 phosphoryliert durch CPK21

MP**TS**IQF**QRS** **ST**A~~A~~E~~A~~A~~A~~NAT VRNYPHHHQK QVQK**V**SLTRG MADVPEHVEL SHTHV**V**GPSQ 60
 CFSVV**V**QDVE APVSTVWSIL SRFEHPQAYK HFVKS**S**CHVVI GDGREVGS**V**R EVRV**V**SGLPA 120
 AF**S**LERLEIM DDDR**H**VIS**S**F VVG**G**DHRLMN YKSVTT**V**HES EEDSDGKKRT RVVESY**V**VDV 180
 PAGNDKEETC SFADTIVRCN LQSLAKLAEN TSKFS 215

D RCAR9 phosphoryliert durch OST1

MP**TS**IQF**QRS** **ST**A~~A~~E~~A~~A~~A~~NAT VRNYPHHHQK QVQK**V**SLTRG MADVPEHVEL SHTHV**V**GPSQ 60
 CFSVV**V**QDVE APVSTVWSIL SRFEHPQAYK HFVKS**S**CHVVI GDGREVGS**V**R EVRV**V**SGLPA 120
 AF**S**LERLEIM DDDR**H**VISFS VVG**G**DHRLMN YKSVTT**V**HES EEDSDGKKRT RVVESY**V**VDV 180
 PAGNDKEETC SFADTIVRCN LQSLAKLAEN TSKFS 215

A RCAR10 phosphoryliert durch CPK23L

MLAVHRPSSA VSDGDSVQIP MMIASFQKRF PSLSRDSTAA RFHTHEVGPN QCCSAVIQEI 60
 SAPISTVWSV VRRFDNPQAY KHFLKSCSVI GGDGDNVGS L RQVHVVSGLP AASSTERLDI 120
 LDDERHVISF SVVGGDHRLS NYRSVTTLHP SPISGTVVVE SYVVDVPPGN TKEETCDFVD 180
 VIVRCNLQSL AKIAENTAAE SKKKMSL 207

B RCAR10 phosphoryliert durch CPK23C

MLAVHRPSSA VSDGDSVQIP MMIASFQKRF PSLSRDSTAA RFHTHEVGPN QCCSAVIQEI 60
 SAPISTVWSV VRRFDNPQAY KHFLKSCSVI GGDGDNVGS L RQVHVVSGLP AASSTERLDI 120
 LDDERHVISF SVVGGDHRLS NYRSVTTLHP SPISGTVVVE SYVVDVPPGN TKEETCDFVD 180
 VIVRCNLQSL AKIAENTAAE SKKKMSL 207

C RCAR10 phosphoryliert durch CPK21

MLAVHRPSSA VSDGDSVQIP MMIASFQKRF PSLSRDSTAA RFHTHEVGPN QCCSAVIQEI 60
 SAPISTVWSV VRRFDNPQAY KHFLKSCSVI GGDGDNVGS L RQVHVVSGLP AASSTERLDI 120
 LDDERHVISF SVVGGDHRLS NYRSVTTLHP SPISGTVVVE SYVVDVPPGN TKEETCDFVD 180
 VIVRCNLQSL AKIAENTAAE SKKKMSL 207

D RCAR10 phosphoryliert durch OST1

MLAVHRPSSA VSDGDSVQIP MMIASFQKRF PSLSRDSTAA RFHTHEVGPN QCCSAVIQEI 60
 SAPISTVWSV VRRFDNPQAY KHFLKSCSVI GGDGDNVGS L RQVHVVSGLP AASSTERLDI 120
 LDDERHVISF SVVGGDHRLS NYRSVTTLHP SPISGTVVVE SYVVDVPPGN TKEETCDFVD 180
 VIVRCNLQSL AKIAENTAAE SKKKMSL 207

A RCAR11 phosphoryliert durch CPK23L – Sequenzabdeckung 99,5%

MPSELTPEER SELKNSIAEF HTYOLDPGSC SSLHAORIHA PPELVWSIVR RFDKPOTYKH 60
FIKSCSVEON FEMRVGCTRD VIVISGLPAN TSTERLDILD DERRVTGFSI IGGEHRLTNY 120
KSVTTVHRFE KENRIWTVVL ESYVDMPEG NSEDDTRMFA DTVVKLNLOK LATVAEAMAR 180
NSGDGSGSOV T 191

B RCAR11 phosphoryliert durch CPK23C – Sequenzabdeckung 94,8%

MPSELTPEER SELKNSIAEF HTYOLDPGSC SSLHAORIHA PPELVWSIVR RFDKPOTYKH 60
FIKSCSVEON FEMRVGCTRD VIVISGLPAN TSTERLDILD DERRVTGFSI IGGEHRLTNY 120
KSVTTVHRFE KENRIWTVVL ESYVDMPEG NSEDDTRMFA DTVVKLNLOK LATVAEAMAR 180
NSGDGSGSOV T 191

C RCAR11 phosphoryliert durch CPK21 – Sequenzabdeckung 91%

MPSELTPEER SELKNSIAEF HTYOLDPGSC SSLHAORIHA PPELVWSIVR RFDKPOTYKH 60
FIKCSVEON FEMRVGCTRD VIVISGLPAN TSTERLDILD DERRVTGFSI IGGEHRLTNY 120
KSVTTVHRFE KENRIWTVVL ESYVDMPEG NSEDDTRMFA DTVVKLNLOK LATVAEAMAR 180
NSGDGSGSOV T 191

D RCAR11 phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 99,5%

MPSELTPEER SELKNSIAEF HTYOLDPGSC SSLHAORIHA PPELVWSIVR RFDKPOTYKH 60
FIKSCSVEON FEMRVGCTRD VIVISGLPAN TSTERLDILD DERRVTGFSI IGGEHRLTNY 120
KSVTTVHRFE KENRIWTVVL ESYVDMPEG NSEDDTRMFA DTVVKLNLOK LATVAEAMAR 180
NSGDGSGSOV T 191

6.5.3 Massenspektrometrische Daten der untersuchten ABF Transkriptionsfaktoren

A ABF1 phosphoryliert durch CPK23L

MGTHIDINNL GGDTSRGNES KPLARQ**SSLY** **SL**TFDELQST LGEPGKDFGS MNMDELLKNI 60
 WTAEDTQAFM TTTSSVAAPG PSGFVPGGNG LQRQGS**LT**LP RTLSQKT**V**DE VWKY**LNS**KEG 120
 SNGNTGTDAL ERQ**Q**TLGEM**T** LEDFLLRAGV VKEDNTQONE NSSSGFYANN GAAGLEFGFG 180
 QPNQNSISFN GNNSSMIMNQ APGLGLKVGG TMQ**Q**Q**Q**PHQ Q**Q**LQ**Q**PHQRL PPTIF**PK**QAN 240
VTFAAPV**N**MV NRGLFETSAD GPAN**S**NM**G**GA GGT**V**TATSPG TSSAEN**N**TWS SPVPY**V**FG**R**G 300
 RRSNTGLEKV VERRQ**K**RM**I**K NRESAARSRA RKQAY**T**LELE AEIESLKL**V**N QDLQ**K**QAE**I** 360
 MKTH**N**SELKE FSKQ**P**PL**L**AK RQCL**R**RTL**T**G PW 392

B ABF1 phosphoryliert durch CPK23C

MGTHIDINNL GGDTSRGNES KPLARQSSLY **SL**TFDELQST LGEPGKDFGS MNMDELLKNI 60
 WTAEDTQAFM TTTSSVAAPG PSGFVPGGNG LQRQGS**LT**LP RTLSQKT**V**DE VWKY**LNS**KEG 120
 SNGNTGTDAL ERQ**Q**TLGEM**T** LEDFLLRAGV VKEDNTQONE NSSSGFYANN GAAGLEFGFG 180
 QPNQNSISFN GNNSSMIMNQ APGLGLKVGG TMQ**Q**Q**Q**PHQ Q**Q**LQ**Q**PHQRL PPTIF**PK**QAN 240
VTFAAPV**N**MV NRGLFETSAD GPAN**S**NM**G**GA GGT**V**TATSPG TSSAEN**N**TWS SPVPY**V**FG**R**G 300
 RRSNTGLEKV VERRQ**K**RM**I**K NRESAARSRA RKQAY**T**LELE AEIESLKL**V**N QDLQ**K**QAE**I** 360
 MKTH**N**SELKE FSKQ**P**PL**L**AK RQCL**R**RTL**T**G PW 392

C ABF1 phosphoryliert durch CPK21

MG**T**HIDINNL GGDTSRGNES KPLARQ**SSLY** **SL**TFDELQ**S**T LGEPGKDFG**S** MNMDELLKNI 60
WT**A**ED**T**Q**A**F**M** **T**TT**S**S**V**A**A**P**G** P**S**G**F**V**P**G**G**N**G** L**Q**R**Q**G**S**L**T**L**P** R**T**L**S**Q**K**T**V**D**E** V**W**K**Y**L**N**S**K**E**G** 120
 SNGNTGTDAL ERQ**Q**TLGEM**T** LEDFLLRAGV VKEDNTQONE NSSSGFYANN GAAGLEFGFG 180
 QPNQNSISFN GNNSSMIMNQ APGLGLKVGG **T**M**Q****Q****Q**PHQ Q**Q**LQ**Q**PHQRL PPTIF**PK**QAN 240
VTFAAPV**N**MV NRGLFETSAD GPAN**S**NM**G**GA GGT**V**TATSPG TSSAEN**N**TWS SPVPY**V**FG**R**G 300
 RRSNTGLEKV VERRQ**K**RM**I**K NRESAARSRA RKQAY**T**LELE AEIE**S**LKL**V**N QDLQ**K**QAE**I** 360
 MKTH**N**SELKE FSKQ**P**PL**L**AK RQCL**R**RTL**T**G PW 392

D ABF1 phosphoryliert durch OST1

MGTHIDINNL GGDTSRGNES KPLARQ**SSLY** **SL**TFDELQST LGEPGKDFG**S** MNMDELLKNI 60
 WTAEDTQAFM TTTSSVAAPG PSGFVPGGNG LQRQGS**LT**LP RTLSQKT**V**DE VWKY**LNS**KEG 120
 SNGNTGTDAL ERQ**Q**TLGEM**T** LEDFLLRAGV VKEDNTQONE NSSSGFYANN GAAGLEFGFG 180
 QPNQNSISFN GNNSSMIMNQ APGLGLKVGG TMQ**Q**Q**Q**PHQ Q**Q**LQ**Q**PHQRL PPTIF**PK**QAN 240
 VTFAAPV**N**MV NRGLFETSAD GPAN**S**NM**G**GA GGT**V**TATSPG TSSAEN**N**TWS SPVPY**V**FG**R**G 300
 RRSNTGLEKV VERRQ**K**RM**I**K NRESAARSRA RKQAY**T**LELE AEIESLKL**V**N QDLQ**K**QAE**I** 360
 MKTH**N**SELKE FSKQ**P**PL**L**AK RQCL**R**RTL**T**G PW 392

A ABF2 phosphoryliert durch CPK23L

MDG**S**MNLGNE PPGDGGGGGG LTRQ**GSIY**SL **TF**DEFQ**SS**VG KDFG**S**MNMDE LLKNIWSAEE 60
 TQAMASGVVP VLGGGQ**EGLQ** LQRQ**GSL**TLP **RTL**SQ**K**TVDQ VWKDLSK**VGS** **SGVGG****S**NLSQ 120
 VAQAQ**SQ**SQ**S** QRQ**Q**TLGEVT LEEFLVRAGV VREEAQVAAR AQIAENNKGG YFGNDANTGF 180
 SVEFQ**Q**SPR VVAAGVMGNL GAETAN**S**LQV **Q****G****S**SLPLNVN GART**TY**Q**Q**SQ QQQPIMP**K**Q**P** 240
 GFGYGT**Q**MGQ LNSPGIRGGG LVGLGDQ**S**LT NNVGFVQ**G**AS AAIPGALGVG AVSPVTPLSS 300
 EGIGK**S**NGDS SSLSPSPYMF NGGVRGRK**S**G TVEK**V**VER**R**Q RRM**I**KNRESA ARSRARKQAY 360
 TVELEAEVAK LKEENDELQ**R** KQARIMEMQ**K** NQ**E**TEM**R**NLL QGGPK**K**KLRR TESGPW 416

B ABF2 phosphoryliert durch CPK23C

MDG**S**MNLGNE PPGDGGGGGG LTRQ**GSIY**SL **TF**DEFQ**SS**VG KDFG**S**MNMDE LLKNIWSAEE 60
 TQAMASGVVP VLGGGQ**EGLQ** LQRQ**GSL**TLP **RTL**SQ**K**TVDQ VWKDLSK**VGS** **SGVGG****S**NLSQ 120
 VAQAQ**SQ**SQ**S** QRQ**Q**TLGEVT LEEFLVRAGV VREEAQVAAR AQIAENNKGG YFGNDANTGF 180
 SVEFQ**Q**SPR VVAAGVMGNL GAETAN**S**LQV **Q****G****S**SLPLNVN GART**TY**Q**Q**SQ QQQPIMP**K**Q**P** 240
 GFGYGT**Q**MGQ LNSPGIRGGG LVGLGDQ**S**LT NNVGFVQ**G**AS AAIPGALGVG AVSPVTPLSS 300
 EGIGK**S**NGDS SSLSPSPYMF NGGVRGRK**S**G TVEK**V**VER**R**Q RRM**I**KNRESA ARSRARKQAY 360
 TVELEAEVAK LKEENDELQ**R** KQARIMEMQ**K** NQ**E**TEM**R**NLL QGGPK**K**KLRR TESGPW 416

C ABF2 phosphoryliert durch CPK21

MDG**S**MNLGNE PPGDGGGGGG LTRQ**GSIY**SL **TF**DEFQ**SS**VG KDFG**S**MNMDE LLKNIWSAEE 60
 TQAMASGVVP VLGGGQ**EGLQ** LQRQ**GSL**TLP **RTL**SQ**K**TVDQ VWKDLSK**VGS** **SGVGG****S**NLSQ 120
 VAQAQ**SQ**SQ**S** QRQ**Q**TLGEVT LEEFLVRAGV VREEAQVAAR AQIAENNKGG YFGNDANTGF 180
 SVEFQ**Q**SPR VVAAGVMGNL GAETAN**S**LQV **Q****G****S**SLPLNVN GART**TY**Q**Q**SQ QQQPIMP**K**Q**P** 240
 GFG**Y**GT**Q**MGQ LNSPGIRGGG LVGLGDQ**S**LT NNVGFVQ**G**AS AAIPGALGVG AVSPVTPLSS 300
 EGIGK**S**NGDS SSLSPSPYMF NGGVRGRK**S**G TVEK**V**VER**R**Q RRM**I**KNRESA ARSRARKQAY 360
 TVELEAEVAK LKEENDELQ**R** KQARIMEMQ**K** NQ**E**TEM**R**NLL QGGPK**K**KLRR TESGPW 416

D ABF2 phosphoryliert durch OST1

MDG**S**MNLGNE PPGDGGGGGG LTRQ**GSIY**SL **TF**DEFQ**SS**VG KDFG**S**MNMDE LLKNIWSAEE 60
 TQAMASGVVP VLGGGQ**EGLQ** LQRQ**GSL**TLP **RTL**SQ**K**TVDQ VWKDLSK**VGS** **SGVGG****S**NLSQ 120
 VAQAQ**SQ**SQ**S** QRQ**Q**TLGEVT LEEFLVRAGV VREEAQVAAR AQIAENNKGG YFGNDANTGF 180
 SVEFQ**Q**SPR VVAAGVMGNL GAETAN**S**LQV **Q****G****S**SLPLNVN GART**TY**Q**Q**SQ QQQPIMP**K**Q**P** 240
 GFGYGT**Q**MGQ LNSPGIRGGG LVGLGDQ**S**LT NNVGFVQ**G**AS AAIPGALGVG AVSPVTPLSS 300
 EGIGK**S**NGDS SSLSPSPYMF NGGVRGRK**S**G TVEK**V**VER**R**Q RRM**I**KNRESA ARSRARKQAY 360
 TVELEAEVAK LKEENDELQ**R** KQARIMEMQ**K** NQ**E**TEM**R**NLL QGGPK**K**KLRR TESGPW 416

A ABF3 phosphoryliert durch CPK23L

MGSRLNFKSF VDGVSEQOPT VGTSLPLTRQ NSVFSLTFDE FQNSWGGGIG KDFGSMNMDE 60
 LLKNIWTAEE SHSMMGNNTS YTNISNGNSG NTVINGGGNN IGGLAVGVGG ESGGFFTGGG 120
 LQRQGSLLTP RTISQKRVDV VWKELMKEDD IGNGVVNGGT SGIPQRQQT^L GEMTLEEFV 180
 RAGVVREEPQ PVESVTNFNG GFYGFSGNGG LGTASNGFVA NQPQDLGNG VAVRQDLLTA 240
 QTOPLOMQOP QMVQOPQMVQ QPQQLIQTOE RPFQKQTTIA FSNTVDVVNR SQPATQCQEV 300
 KPSILGIHNN PMNNLLQAV DFKTGVTVA VSPGSQMSPD LTPKSALDAS LSPVPYMFGR 360
 VRKTGAVLEK VIERRQKRM KNRESAARS ARKQAYTMEL EAEIAQLKEL NEELQKKQVE 420
 IMEKQKNQLL EPLRQPWGMG CKRQCLRRRL TGPW 454

B ABF3 phosphoryliert durch CPK23C

MGSRLNFKSF VDGVSEQOPT VGTSLPLTRQ NSVFS^SSLTFDE FQNSWGGGIG KDFGSMNMDE 60
 LLKNIWTAEE SHSMMGNNTS YTNISNGNSG NTVINGGGNN IGGLAVGVGG ESGGFFTGGG 120
 LQRQGSLLTP RTISQKRVDV VWKELMKEDD IGNGVVNGGT SGIPQRQQT^L GEMTLEEFV 180
 RAGVVREEPQ PVESVTNFNG GFYGFSGNGG LGTASNGFVA NQPQDLGNG VAVRQDLLTA 240
 QTOPLOMQOP QMVQOPQMVQ QPQQLIQTOE RPFQKQTTIA FSNTVDVVNR SQPATQCQEV 300
 KPSILGIHNN PMNNLLQAV DFKTGVTVA VSPGSQMSPD LTPKSALDAS LSPVPYMFGR 360
 VRKTGAVLEK VIERRQKRM KNRESAARS ARKQAYTMEL EAEIAQLKEL NEELQKKQVE 420
 IMEKQKNQLL EPLRQPWGMG CKRQCLRRRL TGPW 454

C ABF3 phosphoryliert durch CPK21

MGSRLNFKS^F VDGVSEQOPT VGTSLPLTRQ NSVFSLTFDE FQNSWGGGIG KDFGSMNMDE 60
 LLKNIWTAEE SHSMMGNNTS YTNISNGNSG NTVINGGGNN IGGLAVGVGG ESGGFFTGGG 120
 LQRQGSLLTP RTISQKRVDV VWKELMKEDD IGNGVVNGGT SGIPQRQQT^L GEMTLEEFV 180
 RAGVVREEPQ PVESVTNFNG GFYGFSGNGG LGTASNGFVA NQPQDLGNG VAVRQDLLTA 240
 QTOPLOMQOP QMVQOPQMVQ QPQQLIQTOE RPFQKQTTIA FSNTVDVVNR SQPATQCQEV 300
 KPSILGIHNN PMNNLLQAV DFKTGVTVA VSPGSQMSPD LTPKSALDAS LSPVPYMFGR 360
 VRKTGAVLEK VIERRQKRM KNRESAARS ARKQAYTMEL EAEIAQLKEL NEELQKKQVE 420
 IMEKQKNQLL EPLRQPWGMG CKRQCLRRRL TGPW 454

D ABF3 phosphoryliert durch OST1

MGSRLNFKSF VDGVSEQOPT VGTSLPLTRQ NSVFSLTFDE FQNSWGGGIG KDFGSMNMDE 60
 LLKNIWTAEE SHSMMGNNTS YTNISNGNSG NTVINGGGNN IGGLAVGVGG ESGGFFTGGG 120
 LQRQGSLL^TLP RTISQKRVDV VWKELMKEDD IGNGVVNGGT SGIPQRQQT^L GEMTLEEFV 180
 RAGVVREEPQ PVESVTNFNG GFYGFSGNGG LGTASNGFVA NQPQDLGNG VAVRQDLLTA 240
 QTOPLOMQOP QMVQOPQMVQ QPQQLIQTOE RPFQKQTTIA FSNTVDVVNR SQPATQCQEV 300
 KPSILGIHNN PMNNLLQAV DFKTGVTVA VSPGSQMSPD LTPKSALDAS LSPVPYMFGR 360
 VRKTGAVLEK VIERRQKRM KNRESAARS ARKQAYTMEL EAEIAQLKEL NEELQKKQVE 420
 IMEKQKNQLL EPLRQPWGMG CKRQCLRRRL TGPW 454

A ABF4 phosphoryliert durch CPK23L

MGTHINFNNL GGGGHPGGEG SSNQMKTGS VMPLARQSSV YSLTFDELQN TLGGPGKDFG 60
 SMNMDELLKS IWTAEEAQAM AMTSAPAATA VAQPGAGIPP PGGNLQRQGS LTLPRITISQK 120
 TVDEVVKCLI TKDGNMEGSS GGGGESNVPP GRQOTLGEMT LEEFLFRAGV VREDNCVQQM 180
 GOVNGNNNNG FYGNSTAAGG LGFGFGQPNQ NSITFNGTND SMILNQPPGL GLKMGGTMQQ 240
 QQQQQQLLQQ QQQQMQQLNQ PHPQORLPQT IFPKQANVAF SAPVNITNKG FAGAANNSIN 300
 NNNGLASYGG TGVTVAAATSP GTSSAENNSL SPVPYVLNRG RRSNTGLEKV IERRQRRMIK 360
 NRESAARSRA RKQAYTLELE AEIEKLKKTN QELQKKAEM VEMQKNELKE TSKRPWGSKR 420
 QCLRRTL TGP 430

B ABF4 phosphoryliert durch CPK23C

MGTHINFNNL GGGGHPGGEG SSNQMKTGS VMPLARQSSV YSLTFDELQN TLGGPGKDFG 60
 SMNMDELLKS IWTAEEAQAM AMTSAPAATA VAQPGAGIPP PGGNLQRQGS LTLPRITISQK 120
 TVDEVVKCLI TKDGNMEGSS GGGGESNVPP GRQOTLGEMT LEEFLFRAGV VREDNCVQQM 180
 GOVNGNNNNG FYGNSTAAGG LGFGFGQPNQ NSITFNGTND SMILNQPPGL GLKMGGTMQQ 240
 QQQQQQLLQQ QQQQMQQLNQ PHPQORLPQT IFPKQANVAF SAPVNITNKG FAGAANNSIN 300
 NNNGLASYGG TGVTVAAATSP GTSSAENNSL SPVPYVLNRG RRSNTGLEKV IERRQRRMIK 360
 NRESAARSRA RKQAYTLELE AEIEKLKKTN QELQKKAEM VEMQKNELKE TSKRPWGSKR 420
 QCLRRTL TGP 430

C ABF4 phosphoryliert durch CPK21

MGTHINFNNL GGGGHPGGEG SSNQMKTGS VMPLARQSSV YSLTFDELQN TLGGPGKDFG 60
 SMNMDELLKS IWTAEEAQAM AMTSAPAATA VAQPGAGIPP PGGNLQRQGS LTLPRITISQK 120
 TVDEVVKCLI TKDGNMEGSS GGGGESNVPP GRQOTLGEMT LEEFLFRAGV VREDNCVQQM 180
 GOVNGNNNNG FYGNSTAAGG LGFGFGQPNQ NSITFNGTND SMILNQPPGL GLKMGGTMQQ 240
 QQQQQQLLQQ QQQQMQQLNQ PHPQORLPQT IFPKQANVAF SAPVNITNKG FAGAANNSIN 300
 NNNGLASYGG TGVTVAAATSP GTSSAENNSL SPVPYVLNRG RRSNTGLEKV IERRQRRMIK 360
 NRESAARSRA RKQAYTLELE AEIEKLKKTN QELQKKAEM VEMQKNELKE TSKRPWGSKR 420
 QCLRRTL TGP 430

D ABF4 phosphoryliert durch OST1

MGTHINFNNL GGGGHPGGEG SSNQMKTGS VMPLARQSSV YSLTFDELQN TLGGPGKDFG 60
 SMNMDELLKS IWTAEEAQAM AMTSAPAATA VAQPGAGIPP PGGNLQRQGS LTLPRITISQK 120
 TVDEVVKCLI TKDGNMEGSS GGGGESNVPP GRQOTLGEMT LEEFLFRAGV VREDNCVQQM 180
 GOVNGNNNNG FYGNSTAAGG LGFGFGQPNQ NSITFNGTND SMILNQPPGL GLKMGGTMQQ 240
 QQQQQQLLQQ QQQQMQQLNQ PHPQORLPQT IFPKQANVAF SAPVNITNKG FAGAANNSIN 300
 NNNGLASYGG TGVTVAAATSP GTSSAENNSL SPVPYVLNRG RRSNTGLEKV IERRQRRMIK 360
 NRESAARSRA RKQAYTLELE AEIEKLKKTN QELQKKAEM VEMQKNELKE TSKRPWGSKR 420
 QCLRRTL TGP 430

A ABI5 phosphoryliert durch CPK23L

MVTRETKLTS EREVESSMAQ ARHNGGGGGE NHPFTSLGRQ **SSIY**SLTLDE FQHALCENGK 60
 NFGSMNMDEF LVSIWNAEEN NNNQQQAAAA AGSHSVPANH NGFNNNNNNG GEGGVGVFSG 120
 GSRGNEDANN KRGIANE**SSL** PRQ**GS**LT**L**LPA PLCRKTVDEV WSEIHRGGGS GNGGDSNGRS 180
 SSSNGQNNAQ NGGETAARQP **T**FGEMTLEDF LVKAGVVREH PTNPKPNPNP NQNQNPSSVI 240
 PAAAQQQLYG VFQGTGDPSF PGQAMGVGDP SGYAKRTGGG GYQQAPPVQA GVCYGGGVGF 300
 GAGGQQMGMV GPLSPVSSDG LGHGQVDNIG GQYGVMGGL RGRKRVDGP VEKVVERQR 360
 RMIKNRESAA RSRARKQAYT VELEAELNQL KEENAQLKHA LAELERKRKQ QYFESLKSRA 420
 QPKLPKSNR LRTLNRNPSC PL 442

B ABI5 phosphoryliert durch CPK23C

MVTRETKLTS EREVESSMAQ ARHNGGGGGE NHPFTSLGRQ **SSIY**SLTLDE FQHALCENGK 60
 NFGSMNMDEF LVSIWNAEEN NNNQQQAAAA AGSHSVPANH NGFNNNNNNG GEGGVGVFSG 120
 GSRGNEDANN KRGIANE**SSL** PRQ**GS**LT**L**LPA PLCRKTVDEV WSEIHRGGGS GNGGDSNGRS 180
 SSSNGQNNAQ NGGETAARQP **T**FGEMTLEDF LVKAGVVREH PTNPKPNPNP NQNQNPSSVI 240
 PAAAQQQLYG VFQGTGDPSF PGQAMGVGDP SGYAKRTGGG GYQQAPPVQA GVCYGGGVGF 300
 GAGGQQMGMV GPLSPVSSDG LGHGQVDNIG GQYGVMGGL RGRKRVDGP VEKVVERQR 360
 RMIKNRESAA RSRARKQAYT VELEAELNQL KEENAQLKHA LAELERKRKQ QYFESLKSRA 420
 QPKLPKSNR LRTLNRNPSC PL 442

C ABI5 phosphoryliert durch CPK21

MV**T**RETKLTS EREVESSMAQ ARHNGGGGGE NHPFTSLGRQ **SSIY**SLTLDE FQHALCENGK 60
 NFGSMNMDEF LVSIWNAEEN NNNQQQAAAA AGSHSVPANH NGFNNNNNNG GEGGVGVFSG 120
 GSRGNEDANN KRGIANE**SSL** PRQ**GS**LT**L**LPA PLCRKTVDEV WSEIHRGGGS GNGGDSNGRS 180
 SSSNGQNNAQ NGGETAARQP **T**FGEMTLEDF LVKAGVVREH PTNPKPNPNP NQNQNPSSVI 240
 PAAAQQQLYG VFQGTGDPSF PGQAMGVGDP SGYAKRTGGG GYQQAPPVQA GVCYGGGVGF 300
 GAGGQQMGMV GPLSPVSSDG LGHGQVDNIG GQYGVMGGL RGRKRVDGP VEKVVERQR 360
 RMIKNRESAA RSRARKQAYT VELEAELNQL KEENAQLKHA LAELERKRKQ QYFESLKSRA 420
 QPKLPKSNR LRTLNRNPSC PL 442

D ABI5 phosphoryliert durch OST1

MVTRETKLTS EREVESSMAQ ARHNGGGGGE NHPFTSLGRQ SSIYSLTLDE FQHALCENGK 60
 NFGSMNMDEF LVSIWNAEEN NNNQQQAAAA AGSHSVPANH NGFNNNNNNG GEGGVGVFSG 120
 GSRGNEDANN KRGIANE**SSL** PRQ**GS**LT**L**LPA PLCRKTVDEV WSEIHRGGGS GNGGDSNGRS 180
 SSSNGQNNAQ NGGETAARQP **T**FGEMTLEDF LVKAGVVREH PTNPKPNPNP NQNQNPSSVI 240
 PAAAQQQLYG VFQGTGDPSF PGQAMGVGDP SGYAKRTGGG GYQQAPPVQA GVCYGGGVGF 300
 GAGGQQMGMV GPLSPVSSDG LGHGQVDNIG GQYGVMGGL RGRKRVDGP VEKVVERQR 360
 RMIKNRESAA RSRARKQAYT VELEAELNQL KEENAQLKHA LAELERKRKQ QYFESLKSRA 420
 QPKLPKSNR LRTLNRNPSC PL 442

6.5.4 Massenspektrometrische Daten der untersuchten Proteinphosphatasen

A ABI1 phosphoryliert durch CPK23L – Sequenzabdeckung 68,4%

MEEVSPAIAG PFRPFSETQM DFTGIRLGKG YCNNQYSNQD SENGDLMVSL PETSSCSVSG 60
 SHGSESRKVL ISRINSPNLN MKESAAADIV VVDISAGDEI NGSDITSEKK MISRTESRSL 120
FEFKSVPLYG FTSICGRRPE MEDAVSTIPR FLOSSSGSML DGRFDPOSAA HFFGVYDGHG 180
GSOVANYCRE RMHLALAEI AKEKPLCDG DTWLEKWKKA LFNSFLRVDS EIESVAPETV 240
GSTSVVAVVF PSHIFVANCG DSRAVLCRGK TALPLSVDHK PDREDEAARI EAAGGKVIOW 300
NGARVFGVLA MRSIGDRYL KPSIIPDPEV TAVKRVKEDD CLILASDGVW DVMTDEEACE 360
MARKRILLWH KKNAVAGDAS LLADERRKEG KDPAAMSAAE YLSKLAIQRG SKDNISVVVV 420
DLKPRRKLKS KPLN 434

B ABI1 phosphoryliert durch CPK23C – Sequenzabdeckung 65,4%

MEEVSPAIAG PFRPFSETQM DFTGIRLGKG YCNNQYSNQD SENGDLMVSL PETSSCSVSG 60
 SHGSESRKVL ISRINSPNLN MKESAAADIV VVDISAGDEI NGSDITSEKK MISRTESRSL 120
FEFKSVPLYG FTSICGRRPE MEDAVSTIPR FLOSSSGSML DGRFDPOSAA HFFGVYDGHG 180
GSOVANYCRE RMHLALAEI AKEKPLCDG DTWLEKWKKA LFNSFLRVDS EIESVAPETV 240
GSTSVVAVVF PSHIFVANCG DSRAVLCRGK TALPLSVDHK PDREDEAARI EAAGGKVIOW 300
NGARVFGVLA MRSIGDRYL KPSIIPDPEV TAVKRVKEDD CLILASDGVW DVMTDEEACE 360
MARKRILLWH KKNAVAGDAS LLADERRKEG KDPAAMSAAE YLSKLAIQRG SKDNISVVVV 420
DLKPRRKLKS KPLN 434

C ABI1 phosphoryliert durch CPK21 – Sequenzabdeckung 71,2%

MEEVSPAIAG PFRPFSETQM DFTGIRLGKG YCNNQYSNQD SENGDLMVSL PETSSCSVSG 60
 SHGSESRKVL ISRINSPNLN MKESAAADIV VVDISAGDEI NGSDITSEKK MISRTESRSL 120
FEFKSVPLYG FTSICGRRPE MEDAVSTIPR FLOSSSGSML DGRFDPOSAA HFFGVYDGHG 180
GSOVANYCRE RMHLALAEI AKEKPLCDG DTWLEKWKKA LFNSFLRVDS EIESVAPETV 240
GSTSVVAVVF PSHIFVANCG DSRAVLCRGK TALPLSVDHK PDREDEAARI EAAGGKVIOW 300
NGARVFGVLA MRSIGDRYL KPSIIPDPEV TAVKRVKEDD CLILASDGVW DVMTDEEACE 360
MARKRILLWH KKNAVAGDAS LLADERRKEG KDPAAMSAAE YLSKLAIQRG SKDNISVVVV 420
DLKPRRKLKS KPLN 434

D ABI1 phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 68,7%

MEEVSPAIAG PFRPFSETQM DFTGIRLGKG YCNNQYSNQD SENGDLMVSL PETSSCSVSG 60
 SHGSESRKVL ISRINSPNLN MKESAAADIV VVDISAGDEI NGSDITSEKK MISRTESRSL 120
FEFKSVPLYG FTSICGRRPE MEDAVSTIPR FLOSSSGSML DGRFDPOSAA HFFGVYDGHG 180
GSOVANYCRE RMHLALAEI AKEKPLCDG DTWLEKWKKA LFNSFLRVDS EIESVAPETV 240
GSTSVVAVVF PSHIFVANCG DSRAVLCRGK TALPLSVDHK PDREDEAARI EAAGGKVIOW 300
NGARVFGVLA MRSIGDRYL KPSIIPDPEV TAVKRVKEDD CLILASDGVW DVMTDEEACE 360
MARKRILLWH KKNAVAGDAS LLADERRKEG KDPAAMSAAE YLSKLAIQRG SKDNISVVVV 420
DLKPRRKLKS KPLN 434

A ABI2 phosphoryliert durch CPK23L – Sequenzabdeckung 67,8%

MDEVSPAVAV PFRPFTDPHA GLRGYCNGES RVTLPESSCS GDGAMKDSSF EINTRODSLT 60
SSSSAMAGVD ISAGDEINGS DEFDPRSMNQ SEKKVLSRTE **S**RSLFEFKCV PLYGVTSICG 120
RRPEMEDSV**S** TIPRFLOV**SS** **S**SLLDGRVTN GFNPHLSAHF FGVYDGHGGS OVANYCRERM 180
HLALTEEIVK EKPEFCDGDT WOEKWKKALF **N**SFMRVDSEI ETVAHAPETV GSTSVVAVVF 240
PTHIFVANCG DSRAVLCRGK TPLALSVDHK PDRDDEAARI EAAGGKVIRW NGARVFGVLA 300
M**S**RSIGDRYL KPSVIPDPEV **T**SVRRVKEDD CLILASDGLW DVMTNEEVCD LARKRILLWH 360
KKNAMAGEAL LPAEKRGEGK DPAAMSAAEY LSKMALQKGS KDNISVVVVVD LKGIRKFKSK 420
 SLN 423

B ABI2 phosphoryliert durch CPK23C – Sequenzabdeckung 81,3%

MDEVSPAVAV PFRPFTDPHA GLRGYCNGES RVTLPESSCS GDGAMKDSSF EINTRODSLT 60
SSSSAMAGVD ISAGDEINGS DEFDPRSMNQ SEKKVLSRTE **S**RSLFEFKCV PLYGVTSICG 120
RRPEMEDSVS TIPRFLOV**SS** **S**SLLDGRVTN GFNPHLSAHF FGVYDGHGGS OVANYCRERM 180
HLALTEEIVK EKPEFCDGDT WOEKWKKALF **N**SFMRVDSEI ETVAHAPETV GSTSVVAVVF 240
PTHIFVANCG DSRAVLCRGK TPLALSVDHK PDRDDEAARI EAAGGKVIRW NGARVFGVLA 300
M**S**RSIGDRYL KPSVIPDPEV **T**SVRRVKEDD CLILASDGLW DVMTNEEVCD LARKRILLWH 360
KKNAMAGEAL LPAEKRGEGK DPAAMSAAEY LSKMALQKGS KDNISVVVVVD LKGIRKFKSK 420
 SLN 423

C ABI2 phosphoryliert durch CPK21 – Sequenzabdeckung 75,2%

MDEVSPAVAV PFRPFTDPHA GLRGYCNGES RVTLPESSCS GDGAMKDSSF EINTRODSL**T** 60
SSSSAMAGVD ISAGDEINGS DEFDPRSMNQ SEKKVLSRTE **S**RSLFEFKCV PLYGVTSICG 120
RRPEMED**S**V**S** TIPRFLOV**SS** **S**SLLDGRVTN GFNPHLSAHF FGVYDGHGGS OVANYCRERM 180
HLALTEEIVK EKPEFCDGDT WOEKWKKALF **N**SFMRVDSEI **E**TVAHAPETV GSTSVVAVVF 240
PTHIFVANCG DSRAVLCRGK TPLALSVDHK PDRDDEAARI EAAGGKVIRW NGARVFGVLA 300
M**S**RSIGDRYL K**S**VIPDPEV **T**SVRRVKEDD CLILASDGLW DVMTNEEVCD LARKRILLWH 360
KKNAMAGEAL LPAEKRGEGK DPAAMSAAEY LSKMALQKGS KDNISVVVVVD LKGIRKFKSK 420
 SLN 423

D ABI2 phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 69,7%

MDEVSPAVAV PFRPFTDPHA GLRGYCNGES RVTLPESSCS GDGAMKDSSF EINTRODSLT 60
SSSSAMAGVD ISAGDEINGS DEFDPRSMNQ SEKKVLSRTE **S**RSLFEFKCV PLYGVTSICG 120
RRPEMEDSVS TIPRFLOV**SS** **S**SLLDGRVTN GFNPHLSAHF FGVYDGHGGS OVANYCRERM 180
HLALTEEIVK EKPEFCDGDT WOEKWKKALF **N**SFMRVDSEI ETVAHAPETV GSTSVVAVVF 240
PTHIFVANCG DSRAVLCRGK TPLALSVDHK PDRDDEAARI EAAGGKVIRW NGARVFGVLA 300
M**S**RSIGDRYL K**S**VIPDPEV **T**SVRRVKEDD CLILASDGLW DVMTNEEVCD LARKRILLWH 360
KKNAMAGEAL LPAEKRGEGK DPAAMSAAEY LSKMALQKGS KDNISVVVVVD LKGIRKFKSK 420
 SLN 423

A PP2CA phosphoryliert durch CPK23L – Sequenzabdeckung 92%

MAGICCGVVG ETEPAAPVDS TSRASLRRL DLLP**S**IKIVA DSAVAPPLEN CRKRQKRETV 60
 VLSTLPGNLD LD**S**NVR**S**ENK KARSAVTNS**N** **S**VTEAE**S**FFS DVPKIGTTSV CGRRRDMEDA 120
VSIHP**S**FLQR NSENHHFYGV FDGHGCSHVA EKCRERLHDI VKKEVEVMAS DEWTETMV**K****S** 180
 FQKMDKEV**S**Q RECNLVVNGA TRSMKN**S**CRC ELQSPQCDAV GSTAVVSVVT PEKIIVS**N**CG 240
 DSRAVLCRNG VAIPLSVDHK PDRPDELIRI QQAGGRVIYW DGARVLGVLA MSRAIGDNYL 300
 KPYVIPDPEV TVTDRTDEDE CLILASDGLW DVVPNETACG VARMCLRGAG AGDD**S**DAAHN 360
 ACSDAALLLT KLALARQ**S**SD NVSVVVVDLR KRRNNQASS 399

B PP2CA phosphoryliert durch CPK23C – Sequenzabdeckung 93 %

MAGICCGVVG ETEPAAPVDS TSRASLRRL DLLP**S**IKIVA DSAVAPPLEN CRKRQKRETV 60
 VLSTLPGNLD LD**S**NVR**S**ENK KARSAVTNS**N** **S**VTEAE**S**FFS DVPKIGTTSV CGRRRDMEDA 120
VSIHP**S**FLQR NSENHHFYGV FDGHGCSHVA EKCRERLHDI VKKEVEVMAS DEWTETMV**K****S** 180
 FQKMDKEV**S**Q RECNLVVNGA TRSMKN**S**CRC ELQSPQCDAV GSTAVVSVVT PEKIIVS**N**CG 240
 DSRAVLCRNG VAIPLSVDHK PDRPDELIRI QQAGGRVIYW DGARVLGVLA MSRAIGDNYL 300
 KPYVIPDPEV TVTDRTDEDE CLILASDGLW DVVPNETACG VARMCLRGAG AGDD**S**DAAHN 360
 ACSDAALLLT KLALARQ**S**SD NVSVVVVDLR KRRNNQASS 399

C PP2CA phosphoryliert durch CPK21 – Sequenzabdeckung 90%

MAGICCGVVG ETEPAAPVDS TSRASLRRL DLLP**S**IKIVA DSAVAPPLEN CRKRQKRETV 60
 VLSTLPGNLD LD**S**NVR**S**ENK KARSAVTNS**N** **S**VTEAE**S**FFS DVPKIGTTSV CGRRRDMEDA 120
VSIHP**S**FLQR N**S**ENHHFYGV FDGHGCSHVA EKCRERLHDI VKKEVEVMAS DEWTETMV**K****S** 180
 FQKMDKEV**S**Q RECNLVVNGA TRSMKN**S**CRC ELQSPQCDAV GSTAVVSVVT PEKIIVS**N**CG 240
 DSRAVLCRNG VAIPLSVDHK PDRPDELIRI QQAGGRVIYW DGARVLGVLA MSRAIGDNYL 300
 KPYVIPDPEV TVTDRTDEDE CLILASDGLW DVVPNETACG VARMCLRGAG AGDD**S**DAAHN 360
 ACSDAALLLT KLALARQ**S**SD NVSVVVVDLR KRRNNQASS 399

D PP2CA phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 96,5%

MAGICCGVVG ETEPAAPVDS TSRASLRRL DLLPSIKIVA DSAVAPPLEN CRKRQKRETV 60
 VLSTLPGNLD LD**S**NVR**S**ENK KARSAVTNS**N** SVTEAE**S**FFS DVPKIGTTSV CGRRRDMEDA 120
VSIHP**S**FLQR NSENHHFYGV FDGHGCSHVA EKCRERLHDI VKKEVEVMAS DEWTETMV**K****S** 180
 FQKMDKEV**S**Q RECNLVVNGA TRSMKN**S**CRC ELQSPQCDAV GSTAVVSVVT PEKIIVS**N**CG 240
 DSRAVLCRNG VAIPLSVDHK PDRPDELIRI QQAGGRVIYW DGARVLGVLA MSRAIGDNYL 300
 KPYVIPDPEV TVTDRTDEDE CLILASDGLW DVVPNETACG VARMCLRGAG AGDD**S**DAAHN 360
 ACSDAALLLT KLALARQ**S**SD NVSVVVVDLR KRRNNQASS 399

A HAB1 phosphoryliert durch CPK23L – Sequenzabdeckung 59,9 %

MEEMTPAVAM TLSLAANTMC ESSPVEITQL KNVTDADLL SENSEQFCN GGTECTMEDV 60
 SELEEVEQD LLKTLSDTRS GSSNVFDEDD VLSVVEDNSA VISEGLLVVD AGSELSLSNT 120
 AMEIDNGRVL ATAIIVGESS IEQVPTAEVL IAGVNQDTNT SEVVIRLPDE NSNHLVKGRS 180
VYELDCIPLW GTVSIQGNRS EMEDAFVSP HFLKLPKML MGDHEGMSPS LTHLTGHFFG 240
VYDGHGGHKV ADYCRDLHF ALAEIERIK DELCKRNTGE GROVQDKVF TSCFLTVDGE 300
IEGKIGRAVV GSSDKVLEAV ASETVGSTAV VALVCSSHIV VSNCGDSRAV LFRGKEAMPL 360
SVDHKPDRED EYARIENAGG KVIOWOGARV FGVLAMRSI GDRYLKPYVI PEPEVTFMPR 420
SREDECLILA SDGLWDMNN QEVCEIARRR ILMWHKNGA PPLAERGKGI DPACOOAADY 480
LSMLALOKGS KDNISIIVID LKAQRKFKTR T 511

B HAB1 phosphoryliert durch CPK23C – Sequenzabdeckung 60,1%

MEEMTPAVAM TLSLAANTMC ESSPVEITQL KNVTDADLL SENSEQFCN GGTECTMEDV 60
 SELEEVEQD LLKTLSDTRS GSSNVFDEDD VLSVVEDNSA VISEGLLVVD AGSELSLSNT 120
 AMEIDNGRVL ATAIIVGESS IEQVPTAEVL IAGVNQDTNT SEVVIRLPDE NSNHLVKGRS 180
VYELDCIPLW GTVSIQGNRS EMEDAFVSP HFLKLPKML MGDHEGMSPS LTHLTGHFFG 240
VYDGHGGHKV ADYCRDLHF ALAEIERIK DELCKRNTGE GROVQDKVF TSCFLTVDGE 300
IEGKIGRAVV GSSDKVLEAV ASETVGSTAV VALVCSSHIV VSNCGDSRAV LFRGKEAMPL 360
SVDHKPDRED EYARIENAGG KVIOWOGARV FGVLAMRSI GDRYLKPYVI PEPEVTFMPR 420
SREDECLILA SDGLWDMNN QEVCEIARRR ILMWHKNGA PPLAERGKGI DPACOOAADY 480
LSMLALOKGS KDNISIIVID LKAQRKFKTR T 511

C HAB1 phosphoryliert durch CPK21 – Sequenzabdeckung 53,4%

MEEMTPAVAM TLSLAANTMC ESSPVEITQL KNVTDADLL SENSEQFCN GGTECTMEDV 60
 SELEEVEQD LLKTLSDTRS GSSNVFDEDD VLSVVEDNSA VISEGLLVVD AGSELSLSNT 120
 AMEIDNGRVL ATAIIVGESS IEQVPTAEVL IAGVNQDTNT SEVVIRLPDE NSNHLVKGRS 180
VYELDCIPLW GTVSIQGNRS EMEDAFVSP HFLKLPKML MGDHEGMSPS LTHLTGHFFG 240
VYDGHGGHKV ADYCRDLHF ALAEIERIK DELCKRNTGE GROVQDKVF TSCFLTVDGE 300
IEGKIGRAVV GSSDKVLEAV ASETVGSTAV VALVCSSHIV VSNCGDSRAV LFRGKEAMPL 360
SVDHKPDRED EYARIENAGG KVIOWOGARV FGVLAMRSI GDRYLKPYVI PEPEVTFMPR 420
SREDECLILA SDGLWDMNN QEVCEIARRR ILMWHKNGA PPLAERGKGI DPACOOAADY 480
LSMLALOKGS KDNISIIVID LKAQRKFKTR T 511

D HAB1 phosphoryliert durch OST1 – Sequenzabdeckung 63%

MEEMTPAVAM TLSLAANTMC ESSPVEITQL KNVTDADLL SENSEQFCN GGTECTMEDV 60
 SELEEVEQD LLKTLSDTRS GSSNVFDEDD VLSVVEDNSA VISEGLLVVD AGSELSLSNT 120
 AMEIDNGRVL ATAIIVGESS IEQVPTAEVL IAGVNQDTNT SEVVIRLPDE NSNHLVKGRS 180
VYELDCIPLW GTVSIQGNRS EMEDAFVSP HFLKLPKML MGDHEGMSPS LTHLTGHFFG 240
VYDGHGGHKV ADYCRDLHF ALAEIERIK DELCKRNTGE GROVQDKVF TSCFLTVDGE 300
IEGKIGRAVV GSSDKVLEAV ASETVGSTAV VALVCSSHIV VSNCGDSRAV LFRGKEAMPL 360
SVDHKPDRED EYARIENAGG KVIOWOGARV FGVLAMRSI GDRYLKPYVI PEPEVTFMPR 420
SREDECLILA SDGLWDMNN QEVCEIARRR ILMWHKNGA PPLAERGKGI DPACOOAADY 480
LSMLALOKGS KDNISIIVID LKAQRKFKTR T 511

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Sophie Pleißner
 Geburtsdatum: 19.06.1983
 Geburtsort: Roth
 Nationalität: deutsch

Berufserfahrung

07/2015 – 12/2015 Anfertigung der Promotion
 Thema: Proteinkinasen der Abscisinsäure-Signaltransduktion -
in vitro Charakterisierung und Regulation
 Betreuer: Prof. Dr. Erwin Grill

07/2011 – 06/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der TU München, Lehrstuhl Botanik, Freising

01/2009 – 06/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Uni Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere

11/2008 – 12/2008 Studentische Hilfskraft der Uni Bayreuth, Lehrstuhl Biopolymere

07/2006 – 10/2008 Studentische Abrufrkraft der Deutschen Post, Niederlassung BRIEF, Nürnberg

Studium

10/2008 - 10/2010 Master Studium „Biochemie und Molekulare Biologie“
 Universität Bayreuth

10/2005 – 08/2008 Bachelor Studium „Biologie“
 Universität Erlangen

Publikation

„Integration of calcium into ABA signalling by calcium-regulated protein kinases“
 S. Pleißner, G. Czap, A. Korte, C. Wellmann and E. Grill,
 Manuskript in Vorbereitung