

**Funktionelle Charakterisierung von AtCPK1 und AtCPK2
aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung einer chemisch-
genetischen Methode**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Maik Böhmer

aus Hamminkeln

Marburg/Lahn 2005

Die Untersuchungen zu vorliegenden Arbeit wurden vom November 2002 bis Oktober 2005 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung molekulare Phytopathologie, in Köln unter Anleitung von Prof. Dr. T. Romeis durchgeführt.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am 09.11.2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Tina Romeis

Tag der mündlichen Prüfung am 14.12.1005

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Funktionelle Charakterisierung von AtCPK1 und AtCPK2
aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung einer chemisch-
genetischen Methode“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

“When a distinguished but elderly scientist states that something is possible, he is almost certainly right. When he states that something is impossible, he is very probably wrong. “

“The only way of discovering the limits of the possible is to venture a little way past them into the impossible. “

ARTHUR C. CLARKE

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 KALZIUM-SIGNALTRANSDUKTION IN PFLANZEN	3
1.2 KALZIUM-ABHÄNGIGE PROTEINKINASEN (CDPKs)	3
1.2.1 <i>Aufbau</i>	5
1.2.2 <i>Biochemische Aktivierung</i>	6
1.2.3 <i>Regulation</i>	7
1.2.4 <i>Funktion</i>	8
1.3 CHEMISCHE INHIBITION	10
1.4 SUBSTRATIDENTIFIZIERUNG	11
1.5 CHEMISCH-GENETISCHE METHODE	11
2 ZIELSETZUNG	15
3 ERGEBNISSE	17
3.1 EXPRESSIONSPROFILE AUSGESUCHTER CDPKS	17
3.1.1 <i>Expression in verschiedenen Pflanzengeweben</i>	17
3.1.2 <i>Regulatorische Elemente in der genomischen Region von AtCPK2</i>	19
3.1.3 <i>Transkriptionelle Regulation nach abiotischem und biotischem Stressstimulus</i>	20
3.1.4 <i>Herstellung und Analyse von Promotor-GUS Linien</i>	25
3.2 CHEMISCH-GENETISCHE ANALYSE	31
3.2.1 <i>Identifizierung der „Gatekeeper“-Aminosäure</i>	31
3.2.2 <i>Biochemische Charakterisierung der ATP-Bindetaschenvarianten</i>	32
3.2.2.1 Rekombinante NtCDPK2-His aus <i>E. coli</i> als Modell-CDPK	33
3.2.2.2 Generierung und Analyse von AtCPK1- und AtCPK2-ATP-Bindetaschenvarianten	38
3.2.3 <i>Herstellung von chemisch-inhibierbaren Mutantenlinien in A. thaliana</i>	39
3.2.3.1 T-DNA Insertionslinien von AtCPK1 und AtCPK2	40
3.2.3.2 Phänotypische Charakterisierung von <i>cpk1-2</i> und <i>cpk2-1</i>	41
3.2.4 <i>Etablierung einer chemisch-genetischen Analyse</i>	44
3.2.4.1 Versuchsplanung	45
3.2.4.2 Bestimmung der Inhibitorkonzentration	46
3.2.5 <i>Chemisch-genetische Analyse von AtCPK1 nach Kältestress</i>	47
3.2.5.1 Transkriptionelle Regulation von Markergenen	47
3.2.5.2 Phosphoregulation von Signalproteinen	48
3.2.5.3 Messung der Veränderungen im Metabolom	51
3.3 PHOSPHOREGULATION	55

3.3.1	<i>Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in AtCPK2</i>	55
3.3.2	<i>Autoinhibierende Phosphorylierung</i>	60
4	DISKUSSION	64
4.1	EXPRESSIONSMUSTER VON CDPKS	64
4.1.1	<i>Gewebespezifische Expression</i>	64
4.1.2	<i>Stressinduzierte Expression</i>	65
4.1.2.1	Abiotischer Stress	65
4.1.2.2	Chemikalien	67
4.1.2.3	Pathogen-Elizitoren und Gen-für-Gen-Interaktion	68
4.1.3	<i>Biologische Funktion von AtCPK2 im Spitzenwachstum</i>	69
4.2	CHEMISCH-GENETISCHE ANALYSE VON ATCPK1 UND ATCPK2	72
4.2.1	<i>Identifizierung der „Gatekeeper“-Aminosäure</i>	72
4.2.2	<i>Biochemische Charakterisierung</i>	74
4.2.3	<i>Substratidentifizierung mittels N⁶-Benzyl-ATP</i>	75
4.2.4	<i>Etablierung chemisch-genetischer Versuche</i>	76
4.2.5	<i>Chemisch-genetische Analyse von AtCPK1 nach Kältestress</i>	77
4.2.5.1	Proteomanalyse	77
4.2.5.2	Metabolomanalyse	78
4.2.6	<i>Ausblick und Anwendungsmöglichkeiten</i>	80
4.3	PHOSPHOREGULATION VON CDPKS	82
4.3.1	<i>Autoinhibition</i>	84
5	MATERIAL UND METHODEN	87
5.1	MATERIAL	87
5.1.1	<i>Pflanzenmaterial</i>	87
5.1.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87
5.1.1.2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	88
5.1.2	<i>Bakterienstämme</i>	88
5.1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	88
5.1.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	88
5.1.3	<i>Vektoren</i>	89
5.1.3.1	Ausgangsvektoren	89
5.1.3.2	In dieser Arbeit hergestellte Vektoren	90
5.1.4	<i>Oligonukleotide</i>	94
5.1.5	<i>Enzyme</i>	96
5.1.6	<i>Chemikalien</i>	96
5.1.7	<i>Nährmedien</i>	96
5.1.8	<i>Puffer und Lösungen</i>	97
5.2	METHODEN	100
5.2.1	<i>Pflanzentechniken</i>	100
5.2.1.1	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	100
5.2.1.2	Sterilisation von <i>A. thaliana</i> Samen	101

5.2.1.3	Stabile <i>A. thaliana</i> Transformation	101
5.2.1.4	Selektion stabiler transgener Pflanzen auf Erde	101
5.2.1.5	Segregationsanalyse auf Platte	102
5.2.1.6	Kultivierung von <i>N. benthamiana</i>	102
5.2.1.7	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i>	102
5.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	103
5.2.2.1	Schnelle Aufreinigung von DNA aus <i>Arabidopsis</i>	103
5.2.2.2	Aufreinigung von DNA aus <i>Arabidopsis</i> (mit verbesserter Qualität)	103
5.2.2.3	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis</i>	103
5.2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	104
5.2.2.5	Punktmutagenese	104
5.2.2.6	cDNA-Synthese (RT-PCR)	105
5.2.2.7	RealTime PCR	105
5.2.2.8	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien	105
5.2.2.9	Restriktionsanalyse von DNA	105
5.2.2.10	DNA Ligation	106
5.2.2.11	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	106
5.2.2.12	Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	106
5.2.2.13	DNA-Sequenzierung	106
5.2.2.14	Sequenzanalyse	106
5.2.2.15	Kultivierung von <i>E. coli</i>	106
5.2.2.16	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	107
5.2.2.17	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	107
5.2.2.18	Herstellung elektro-kompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen	107
5.2.2.19	Transformation elektro-kompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen	108
5.2.2.20	Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i> Stämmen	108
5.2.3	<i>Biochemische Methoden</i>	108
5.2.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	108
5.2.3.2	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	109
5.2.3.3	Proteinbestimmung	109
5.2.3.4	Pflanzengesamtproteinextraktion	109
5.2.3.5	Proteinaufreinigung mittels StrepII-Epitop-tag	109
5.2.3.6	Denaturierende SDS-Gelelektrophorese	110
5.2.3.7	Proteinfärbung in SDS-Gelen	110
5.2.3.8	Gesamtproteinextraktion für die 2D-Gelelektrophorese	110
5.2.3.9	2D-Gelelektrophorese und ProQ-Diamond Färbung	111
5.2.3.10	Kinaseaktivitätsbestimmungen	111
5.2.3.11	K _i -Bestimmungen	112
5.2.3.12	Histochemische Färbung der β -Glucuronidase-Aktivität	112
5.2.4	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i>	112
5.2.5	<i>Funktionelle Tests zur Pollenkeimung</i>	113
5.2.5.1	<i>In-vitro</i> Keimung von <i>Arabidopsis</i> Pollen	113
5.2.5.2	Fluorescein-Diacetat Färbung	113
5.2.6	<i>Proteinmodellierungen</i>	113
5.2.7	<i>Chemisch-genetische Methoden</i>	113

5.2.7.1	Synthese von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-N}^6\text{-Benzyl-ATP}$ mittels Nukleosid-Diphosphokinase	113
5.2.7.2	Kultivierung von <i>A. thaliana</i> in hydroponischen Schüttelkulturen	113
5.2.8	<i>Massenspektrometrie</i>	114
5.2.8.1	Proteinspaltung durch Trypsin in Lösung	114
5.2.8.2	Proteinspaltung durch Trypsin im Gel	114
5.2.8.3	Entsalzung mittels ZipTip C18	114
5.2.8.4	Nanospray-MS/MS Analyse	114
6	LITERATUR	116
	DANKSAGUNG	128
	LEBENS LAUF	129

Abkürzungsverzeichnis

1-NA-PP1	4-amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthyl)pyrazolo[3.4-d]pyrimidin
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
³² P	Radioaktives Isotop Phosphor-32
ABA	Abscisinsäure
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulphonyl-fluorid
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Avr	Avirulenzgen/-produkt
CBL	Calcineurin-B-ähnliches Protein
CCD	Kälte- und CDPK-abhängige Dephosphorylierung
CCP	Kälte- und CDPK-abhängige Phosphorylierung
CDPK/CPK	Kalzium-abhängige Proteinkinase
CF	Resistenzgen gegen <i>Cladosporium fulvum</i>
CIPK	CBL-interagierende Proteinkinase
CLD	Calmodulin-ähnliche Domäne
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
Cp	<i>Cucurbita pepo</i>
Da	Molekulargewicht, Dalton
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FDA	Fluorescein-Diacetat
GA	Gibberellinsäure
GABA	4-Aminobutyrat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GUS	β-Glucuronidase
HR	Hypersensitive Antwort
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
J	Junction-Domäne
kb	Kilobasen
K _i	Inhibitor-Dissoziationskonstante
K _m	Michaelis-Menten Konstante
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
Le	<i>Lycopersium esculentum</i>
m/z	Masse/Ladungszahl

MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Met	Methionin
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
V	Variable Domäne
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pathovar tomato
Q-TOF	Quadrupole-time of flight
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
Ser	Serin
T	Trypsinfragment
Thr	Threonin
VIGS	Virus-induziertes Gen-Silencing
VK	Konstitutiv aktive CDPK, bestehend aus variabler und Kinase-Domäne
V_{\max}	Maximale Enzymaktivität
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
Zm	<i>Zea mays</i>

Zusammenfassung

Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) haben eine biologische Funktion in einer Reihe von zellulären Prozessen, was durch Überexpressionsanalysen und auf Kosuppression-basierten Silencing-Untersuchungen gezeigt werden konnte. Die Untersuchung von CDPK-Mutanten hat jedoch bisher, vermutlich aufgrund der hohen funktionellen Redundanz oder aufgrund von Anpassungsmechanismen der Pflanzen, zu keinen phänotypischen Auffälligkeiten geführt. Ausschließlich im Falle von NtCDPK2 aus Tabak war es bislang möglich, die biologische Funktion einer einzelnen Isoform aufzuklären.

In dieser Arbeit wurde eine chemisch-genetische Methode etabliert, die es ermöglicht, isoformspezifische Untersuchungen von CDPKs durchzuführen. Eine Mutation der ATP-Bindetasche verändert die Nukleotidbindeeigenschaften von CDPKs daraufhin, dass sie durch den Kinaseinhibitor 1-NA-PP1 inhibiert werden können. Durch eine biochemische Charakterisierung von NtCDPK2 als Modellenzym konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Mutation in CDPKs um eine funktionell stille Mutation handelte, die keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität und die Substratspezifität hat.

Für eine funktionelle Charakterisierung wurden basierend auf Microarray-Expressionsdaten die beiden zu NtCDPK2 homologen Isoformen AtCPK1 und AtCPK2 aus *A. thaliana* ausgewählt. Anhand klassischer genetischer Methoden, wie der Analyse von Promotor-GUS Linien, konnte gezeigt werden, dass es sich bei AtCPK1 um eine ubiquitär exprimierte CDPK handelt. AtCPK2 zeigte hingegen eine spezifische Lokalisation in der Wurzelspitze und in Zellen, die sich durch Spitzenwachstum auszeichnen, wie beispielsweise Pollen. Eine Untersuchung des Pollenschlauchwachstums in *cpk2*-Mutanten zeigte, dass die Pollenschläuche signifikant kürzer waren als in Wildtyppflanzen.

Für eine reverse chemisch-genetische Analyse von AtCPK1 nach Kältestress wurde eine T-DNA Insertionslinie dieser Isoform mit der ATP-Bindetaschenvariante von AtCPK1 komplementiert. Eine Analyse von Veränderungen im Phosphoproteom nach Kältestress identifizierte 5 Proteine, die ein differentielles Phosphorylierungsmuster nach chemischer Inhibition zeigten. Eine Metabolomanalyse ergab verschiedene Metabolite, die differentiell reguliert wurden.

In dieser Arbeit konnte durch eine klassische Mutantanalyse von AtCPK2, die Etablierung einer chemisch-genetischen Methode für die Analyse von CDPKs und deren Anwendung für

AtCPK1 Hinweise auf biologische Funktionen dieser Isoformen erhalten werden. Dies zeigt, dass die chemisch-genetische Methode klassische genetische Ansätze bei der funktionellen Charakterisierung von CDPKs ergänzen kann und, wie im Falle von AtCPK1, oftmals als einzige Methode eine isoformspezifische Untersuchung gestattet.

In einem zweiten Teil wurde in dieser Arbeit die Phosphoregulation von CDPKs näher untersucht. Nach Expression in *N. benthamiana* konnte eine weitere, stimulusabhängige *in vivo* Phosphorylierungsstelle in AtCPK2 bestimmt werden. Zudem wurde für eine Phosphorylierungsstelle in der ATP-Bindetasche von NtCDPK2 eine mögliche Funktion in der Regulation der Kinaseaktivität postuliert. Diese Phosphorylierungsstelle in der ATP-Bindetasche könnte die Basis eines noch nicht beschriebenen Regulationsmechanismus bilden, der Ähnlichkeiten mit der Regulation von Cyclin-abhängigen Kinasen hat.

1 Einleitung

1.1 Kalzium-Signaltransduktion in Pflanzen

Unterschiedliche Signale, wie Hormone, Licht, mechanische Belastungen und Pathogen-Elizitoren, führen zu Veränderungen der Kalziumkonzentrationen in der Zelle (Sanders *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2001; Rudd und Franklin-Tong, 2001). Diese Veränderungen werden durch eine Reihe von Kalzium-bindenden Proteinen in der Zelle perzipiert. In Pflanzen gibt es drei Klassen von Kalzium-bindenden Proteinen, die eine Veränderung der Kalziumkonzentration in Protein-Phosphorylierungen übersetzen können. Dies sind Calcineurin-B-ähnliche (CBL) Proteine, die CBL-interagierende Proteinkinasen (CIPKs) binden, Calmodulin, das mit Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen interagiert und Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs). Von diesen Kalzium-Sensoren sind CDPKs die einzigen, die Kalzium-bindende Funktion und Kinaseaktivität in einem Molekül vereinen.

1.2 Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs)

CDPKs sind Serin/Threonin-Kinasen, die in Pflanzen und einige Protisten, wie z. B. dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* (Zhao *et al.*, 1993) vorkommen. Höhere Pflanzen, wie *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* besitzen Multigenfamilien mit 34 bzw. 29 Familienmitgliedern (Harmon *et al.*, 2001; Asano *et al.*, 2005). Alle 34 CDPK-Isoformen aus *A. thaliana* werden, wie ESTs, cDNAs und tiling-Arrays zeigen, exprimiert (Harper *et al.*, 1993; Urao *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1996; Hrabak *et al.*, 1996; Harmon *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Honys und Twell, 2003). Basierend auf ihren phylogenetischen Verwandtschaftsgraden können diese CDPKs in vier phylogenetische Untergruppen eingeteilt werden (Abbildung 1-1; Cheng *et al.*, 2001; Harmon *et al.*, 2001).

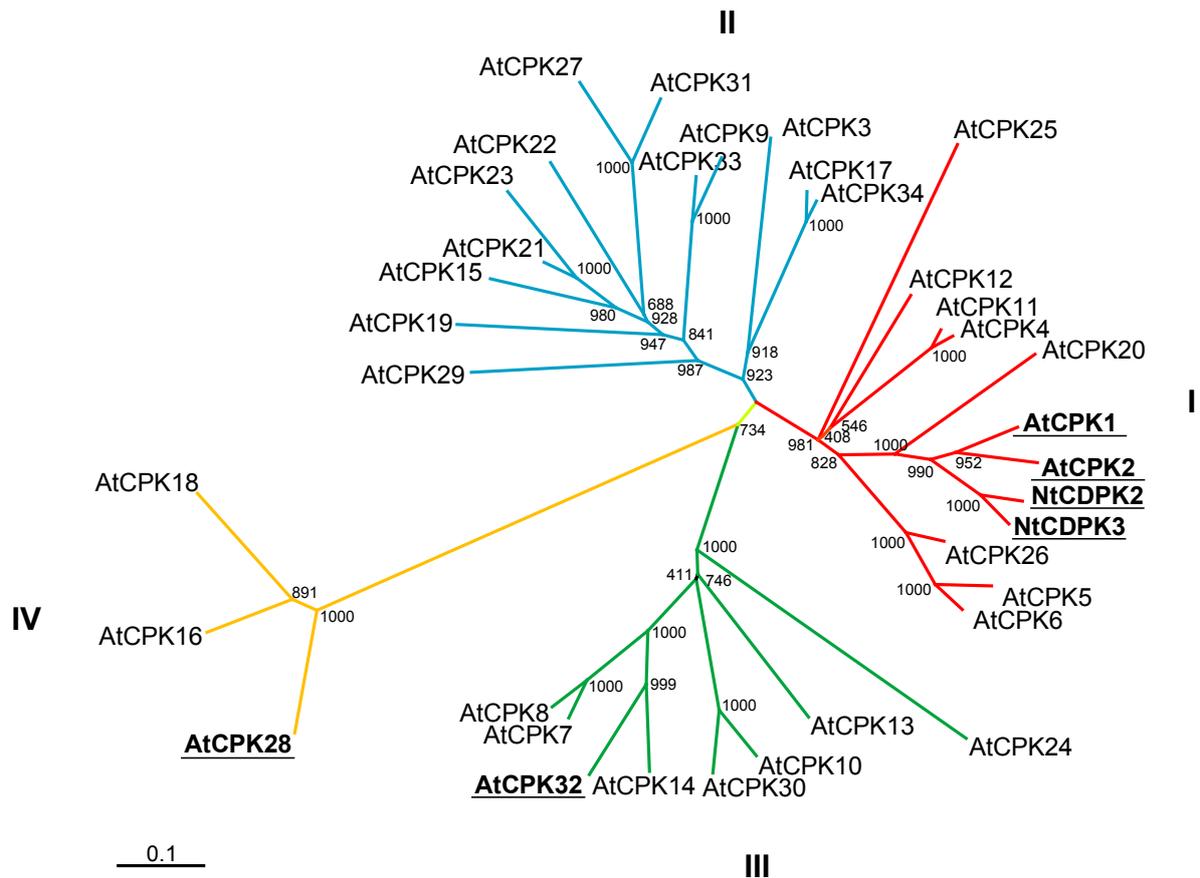


Abbildung 1-1 Phylogenetischer Stammbaum der *A. thaliana* CDPK-Genfamilie unter Berücksichtigung von NtCDPK2 und NtCDPK3 aus *N. tabacum*. Der phylogenetische Baum wurde durch Sequenzvergleich der gesamten Proteinsequenzen erstellt (AlignX (Informax)). Die Länge der Äste gibt den phylogenetischen Abstand der einzelnen CDPKs wieder, Bootstrap-Werte sind als Zahlen an den Knotenpunkten angegeben. Die Klassifizierung in vier Untergruppen erfolgte, wie zuvor beschrieben (Cheng *et al.*, 2002). CDPKs, die in dieser Arbeit beschrieben werden, sind markiert.

Es gibt bislang keine Daten, die darauf hinweisen, dass eine phylogenetische Verwandtschaft von CDPKs auf eine ähnliche biologische Funktion schließen lässt. Einerseits führt die Überexpression von zwei konstitutiv aktive Formen von AtCPK10 und AtCPK30, zwei nahe verwandte CDPKs aus Untergruppe III, zur Induktion eines Salz-, Kälte-, Dunkelheit- und Abscisinsäure (ABA)-induzierbaren Promotors (HVA-1) in der Abwesenheit der entsprechenden Stresstimuli (Sheen, 1996; Yoon *et al.*, 1999). Andererseits zeigen CDPKs aus unterschiedlichen phylogenetischen Untergruppen eine biochemische Aktivierung nach Behandlung der Pflanzen mit dem bakteriellen Elizitor Flagellin (A.-C. Cazalé und T. Romeis, unveröffentlicht).

1.2.1 Aufbau

Alle CDPKs zeigen eine charakteristische Domänenstruktur, bestehend aus vier verschiedenen Domänen: variable Domäne (V), Kinase-Domäne (K), Junction-Domäne (J) und Calmodulin-ähnliche Domäne (CLD). Der Vergleich der N-terminalen variablen Domäne zeigt große Unterschiede zwischen den CDPKs in Bezug auf Länge und Sequenz. Die anschließende Kinase-Domäne besitzt hingegen eine hohe Homologie zwischen den einzelnen Isoformen. Die Junction-Domäne besitzt einen autoinhibitorischen Bereich, der der Regulation der Kinase in Abhängigkeit von der Kalziumbindung dient. Die Calmodulin-ähnliche Domäne besitzt vier funktionelle EF-Hände, die Kalzium binden. EF-Hände bestehen aus zwei α -Helices aus je etwa 10-12 Aminosäuren, die durch eine Schleife von 12 Aminosäuren verbunden sind und die Kalzium-Bindetasche bilden.

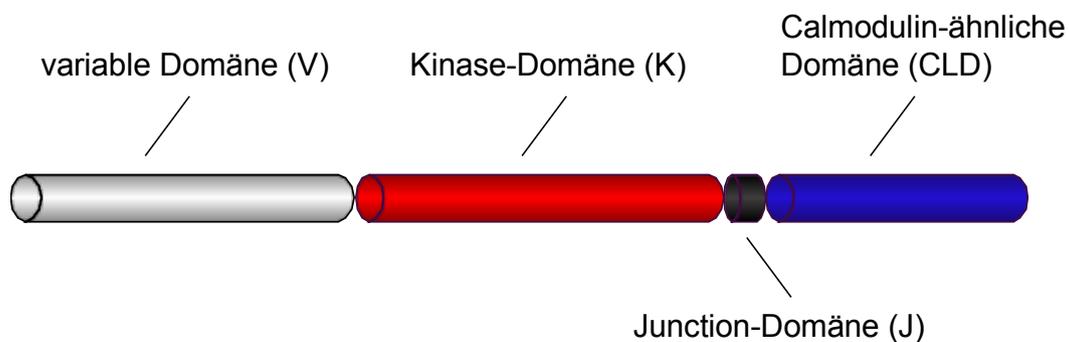


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der konservierten Domänenstruktur von CDPKs. Dargestellt ist die variable Domäne, welche die höchste Variabilität zwischen den CDPKs zeigt und in vielen Isoformen eine N-terminale Myristoylierung trägt, die Serin/Threonin-Kinasedomäne, die autoinhibitorische Junction-Domäne und die Kalzium-bindende Calmodulin-ähnliche Domäne mit vier EF-Händen.

Eine N-terminale Myristoylierungssequenz kann in 24 der 34 CDPKs aus *A. thaliana* durch einen Vergleich mit der PROSITE Datenbank (Bucher und Bairoch, 1994) bestimmt werden. Myristoylierungen sind Proteinmodifikationen, die eine Anheftung an Membranen ermöglichen. Bislang ist für drei CDPKs experimentell eine Myristoylierung gezeigt worden: CpCPK1 aus Zucchini (*Cucurbita pepo*; Ellard-Ivey *et al.*, 1999), LeCPK1 aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*; Rutschmann *et al.*, 2002) und AtCPK2 aus *A. thaliana* (Lu und Hrabak, 2002). Es ist zudem gezeigt worden, dass diese experimentell bestätigten Myristoylierungen essentiell für eine Anheftung dieser CDPKs an Membranen, wie der Plasmamembran (Ellard-Ivey *et al.*, 1999; Rutschmann *et al.*, 2002) und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Lu und Hrabak, 2002) sind. NtCDPK2 aus Tabak zeigt

nach Mutation der vorhergesagten Myristoylierungsstelle keine Membranlokalisation mehr und eine ektopische Expression dieser Variante kann keinen Zelltod-Phänotyp mehr induzieren (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht). Dies bedeutet, dass die Membranlokalisation für die biologische Funktion erforderlich ist. Dies kann eventuell durch eine Positionierung nahe der Quelle des Kalziumeinstroms oder nahe eines *in vivo* Substrates erklärt werden. Für viele weitere CDPKs ist eine Membranlokalisation beschrieben worden, auch wenn experimentelle Bestätigungen für Myristoylierungen dieser CDPKs bislang fehlen (Pical *et al.*, 1993; Anil *et al.*, 2003; Chehab *et al.*, 2004).

1.2.2 Biochemische Aktivierung

Basierend auf den biochemischen *in vitro* Arbeiten der Arbeitsgruppen von Alice Harmon und Jeffrey Harper (Harmon *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996; Yoo und Harmon, 1996; Vitart *et al.*, 2000) ist ein Modell zur Aktivierung von CDPKs nach Kalziumbindung aufgestellt worden (Abbildung 1-3). Dieses Modell konnte um experimentelle Ergebnisse von NtCDPK2 ergänzt werden (Romeis *et al.*, 2001; Böhmer *et al.*, 2005). Nach Stimulation der Pflanze mit biotischen und abiotischen Stressen *in vivo* zeigt NtCDPK2 eine Konformationsänderung (Romeis *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2001). Diese Konformationsänderung führt zu einer Mobilitätsverschiebung in der gelelektrophoretischen Auftrennung, wodurch sich mindestens zwei Formen von NtCDPK2 voneinander unterscheiden lassen.

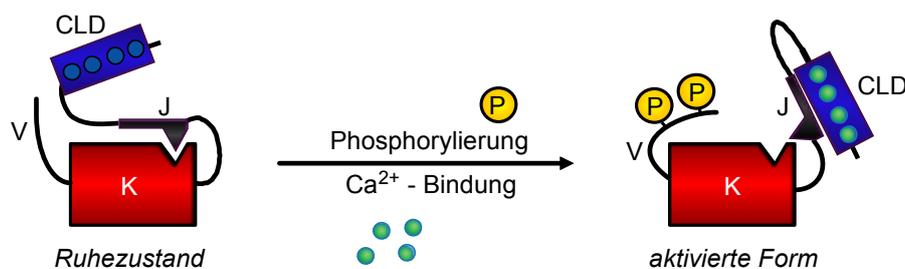


Abbildung 1-3 Modell der biochemischen Aktivierung von CDPKs. Im Ruhezustand bindet der autoinhibitorische Bereich der Junction-Domäne an das aktive Zentrum der Kinase. Nach Kalziumbindung kommt es zu einer Konformationsänderung der CLD und die Junction-Domäne wird aus der Kinase-Domäne gezogen (Harmon *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996; Yoo und Harmon, 1996; Vitart *et al.*, 2000). Dadurch wird die Kinase aktiviert. In NtCDPK2 kommt es zeitgleich zu Phosphorylierungen in der variablen Domäne, was zu einer Änderung der Gesamtkonformation der CDPK führt (Romeis *et al.*, 2000; Böhmer *et al.*, 2005).

Das Aktivierungsmodell beschreibt diese beiden Formen vereinfacht als Ruhezustand und aktivierte Form. Im Ruhezustand bindet die autoinhibitorische Region der Junction-Domäne

als Pseudosubstrat an das aktive Zentrum der Kinase. Die Bindung von Kalzium an die CLD induziert eine Konformationsänderung, wodurch die Junction-Domäne aus dem aktiven Zentrum der Kinase gezogen und die Kinase aktiviert wird. Dieses Modell wird unterstützt durch neue NMR-Studien (Weljie und Vogel, 2004) und es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Konformationsänderung nach Kalziumbindung abhängig ist von der Junction-Domäne (Freymark, 2005).

1.2.3 Regulation

Die Menge an Signalwegen, die Kalzium als Botenstoff nutzen, und die große Anzahl Kalzium-bindender Proteine und interagierender Proteinkinasen lässt die Frage aufkommen, wie auf einen bestimmten Stressstimulus eine spezifische physiologische Antwort erzeugt werden kann. Drei Faktoren sind an der Erzeugung einer passenden Antwort beteiligt: 1. Die Aktivierung von Kalzium-bindenden Proteinen geschieht nicht primär über die Erhöhung der Kalziumkonzentration, sondern über spezifische Kalzium-Signaturen. Diese sind abhängig von der Quelle des Kalziumeinstroms und von der Amplitude und Kinetik der Kalzium-Oszillationen (Malhó *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001; Rudd und Franklin-Tong, 2001). Spezifische Kalzium-Signaturen werden durch Proteine mit unterschiedlichen Kalzium-Bindeeigenschaften erkannt (Luan *et al.*, 2002). CDPKs zeigen eine wesentlich höhere Variabilität der Kalzium-Bindeeigenschaften als beispielsweise Calmodulin-abhängige Kinasen, da jede CDPK ihren individuellen Kalziumsensor besitzt. 2. Eine spezifische Aktivierung Kalzium-bindender Proteine ist abhängig von der gewebespezifischen und intrazellulären Lokalisation. Im Gegensatz zu anderen Ionen kann Kalzium nicht frei in der Zelle diffundieren (Trewavas, 1999), sondern verbleibt immer nahe den Quellen des Kalziumausstroms. Pflanzen haben verschiedene Kalziumspeicher, wodurch es nach Kalzium-Freisetzung immer nur zu einer sehr lokalen Erhöhung der Kalziumkonzentration kommt. 3. Kalzium-bindende Proteine werden zusätzlich über posttranslationale Modifikationen reguliert (Harper und Harmon, 2005). Dabei spielen vor allem Phosphorylierungen eine wichtige Rolle. Autophosphorylierungen wurden in nativen und rekombinanten CDPKs identifiziert (Saha und Singh, 1995; Chaudhuri *et al.*, 1999; Harmon *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2001). Die Rolle dieser Autophosphorylierungen in der Regulation der CDPK-Funktion ist allerdings noch für keine CDPK abschließend geklärt worden. Gezeigt wurde, dass es im Falle von NtCDPK2 zu einer Autophosphorylierung und einer Phosphorylierung durch eine fremde Kinase nach biotischem und abiotischem Stressstimulus kommt (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht). Nach Phosphorylierung

kommt es zu einem Anstieg der Kinaseaktivität *in vitro* (Romeis *et al.*, 2001). Zudem wurde gezeigt, dass diese Phosphorylierungen einen Einfluss auf die biologische Funktion von NtCDPK2 haben (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht). Mutierte Formen von NtCDPK2, in denen die entsprechenden Phosphorylierungsstellen zu Aspartat mutiert worden sind, zeigten nach Expression in *N. benthamiana* einen stärkeren Zelltod-induzierenden Phänotyp (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht).

1.2.4 Funktion

Verschiedene Untersuchungsmethoden sind verwendet worden, die biologische Funktion einzelner CDPK-Isoformen zu untersuchen. In reversen genetischen Ansätzen wurden *A. thaliana* Linien mit Defizienzen für einzelne CDPKs auf offensichtliche phänotypische Veränderungen untersucht. In einem Beispiel wurden defiziente Linien von sieben der acht am stärksten exprimierten CDPKs in Pollen untersucht. In keiner der defizienten Linien konnte eine phänotypische Auffälligkeit gegenüber Wildtyp-Pollen beobachtet werden (Harper und Harmon, 2005). Im Vergleich dazu zeigte ein Homologie-basiertes Gen-Silencing einer CDPK in Mais, dass CDPKs eine Rolle in der Pollenentwicklung spielen (Estruch *et al.*, 1994). Silencing-Konstrukte wurden nach der Initiation der *in vitro*-Pollenkeimung in die Pollenschläuche appliziert, was zu einer Störung des Pollenschlauchwachstums führte. Für MtCDPK1 aus *Medicago truncatula* konnte mit Hilfe eines RNA-Silencing-Ansatzes eine Reihe von pleiotropen Effekten in der Wurzel gezeigt werden. MtCDPK1 ist in der Wachstumszone der Wurzel und in entstehenden und wachsenden Wurzelhaaren exprimiert. Silencing von MtCDPK1 führte zu weniger und kürzeren Wurzelhaaren, kürzeren kortikalen Wurzelzellen und zu insgesamt reduzierter Wurzelmasse. Zusätzlich wurde in Silencing-Linien von MtCDPK1 eine Veränderung der Expressionsmuster von Genen, die eine Rolle in der Pathogenabwehr oder Zellwandsynthese haben, festgestellt. Darüber hinaus zeigten sich Änderungen der Zellwand, des Aktinzytoskeletts, der Produktion von Sauerstoffradikalen und bakterieller und pilzlicher Symbiosen (Ivashuta *et al.*, 2005). Für NtCDPK2 und NtCDPK3 aus Tabak konnte mittels eines Silencing-Ansatzes eine Funktion in der Gen-für-Gen Interaktion gefunden werden. In einer inkompatiblen Interaktion zwischen Wirtspflanze und Pathogen ist die Resistenz abhängig vom Vorhandensein eines pflanzlichen Resistenzgens (*R*) und eines pathogenen Avirulenzgens (*Avr*) (Flor, 1942; Oort, 1944; Flor, 1946). Im Detail untersucht worden ist das Avirulenzgen-Produkt Avr9 aus dem Pilz *Cladosporium fulvum* und das zugehörige Resistenzgen-Produkt Cf-9 aus der Wirtspflanze Tomate. Nach einer Gen-für-Gen Interaktion zwischen *C. fulvum* und Tomate

kommt es zur Ausbildung einer hypersensitiven Antwort (HR). Dabei induzieren Mesophyllzellen, in einigen Fällen auch Schließzellen und Epidermiszellen, einen programmierten Zelltod. Dies kann die Pflanze in einigen Fällen als Schutzmechanismus nutzen, um dem Pilz den Zugang zu Wasser und Nährstoffen zu beschränken (Joosten und de Wit, 1999). Transgene *N. tabacum* Pflanzen, die Cf-9 exprimieren, zeigen ebenfalls eine HR, wenn sie durch Infiltration von Avr9 induziert werden. Viral-induziertes Gen-Silencing (VIGS) von NtCDPK2 und NtCDPK3 führte in diesen Tabakpflanzen zu einer Verzögerung der Hypersensitiven Antwort (HR) nach Elizitierung mit dem Avirulenzgen-Produkt Avr9 (Romeis *et al.*, 2001). Ähnliche Resultate wurden auch mit dem CF-4/Avr4 Gen-für-Gen-System erzielt (Romeis *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse aus den MtCDPK1- und NtCDPK2/NtCDPK3-Analysen deuten auf eine Rolle von CDPKs in der Pathogenabwehr hin. In keinem der Silencing-Ansätze konnte aber bislang gezeigt werden, dass nur eine einzige CDPK-Isoform inhibiert wurde. Nach intensiven Analysen von Insertions-Mutanten in einzelnen Isoformen konnte bislang kein ungewöhnlicher Phänotyp nachgewiesen werden. Dies könnte auch eine hohe funktionelle Redundanz der Isoformen bedeuten. In den Silencing-Ansätzen kam es vermutlich zur Inhibition von mehreren Mitgliedern einer phylogenetischen CDPK-Untergruppe, was die phänotypischen Auffälligkeiten erklären würde. Dies bedeutet, dass die Silencing-Methoden zwar Hinweise darauf geben, in welchen zellulären Prozessen CDPKs eine Rolle spielen, doch zur Analyse isoformspezifischer Funktionen eignet sich diese Methode nicht.

Eine alternative Methode zur Analyse von CDPK-Funktionen ist der Einsatz konstitutiv aktiver CDPKs. Konstitutiv aktive CDPKs zeigen Kinaseaktivität unabhängig von einer Kalziumbindung und können erzeugt werden, durch Mutation von Schlüsselaminosäuren in der autoinhibitorischen Pseudosubstratregion (Vitart *et al.*, 2000) oder durch Deletion der J- und CLD-Domäne (VK-Konstrukte) (Harmon *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1994). Die Expression von NtCDPK2-VK in *N. tabacum* führt zu einer HR nach der Applikation eines milden abiotischen Stresses, der in Wildtyppflanzen keinen Effekt auslöste (Ludwig *et al.*, 2005). Neben der lokalen Induktion des Zelltods wurden auch systemische Antworten der Pflanzen induziert, was durch eine Ausbreitung der HR in nicht-induzierte Bereiche zu erkennen war. Zusätzlich zum induzierten Zelltod kam es in Pflanzen, die NtCDPK2-VK exprimierten zu einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die ROS-Produktion in Pflanzen hat einen direkten antimikrobiellen Effekt und/oder dient als Signal

für die Aktivierung der Pathogenabwehr. Die Produktion von ROS durch NADPH-Oxidase ist in Pflanzen als Kalzium- und phosphorylierungsabhängig beschrieben worden (Mehdy, 1994; Grant *et al.*, 2000). Die Behandlung mit Calmodulin/CDPK-Inhibitoren unterdrückte die ROS-Produktion (Xing *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass die heterologe Expression der zu NtCDPK2 homologen Isoform aus *A. thaliana*, AtCPK1, in Tomatenprotoplasten zu einer Induktion der ROS-Produktion führt (Xing *et al.*, 2001). Die Induktion der HR durch NtCDPK2-VK korreliert vermutlich mit einer Induktion der ROS-Produktion durch die Aktivierung von NADPH-Oxidase. Zusätzlich ist gezeigt worden, dass die Phytohormonsynthese von Ethylen und Jasmonsäure in der Zelle nach NtCDPK2-VK Expression induziert wurde, und dass eine Interaktion mit einem MAPK-Signalweg existiert, über die biotische und abiotische Stressantworten reguliert werden könnten (Ludwig *et al.*, 2005).

Zusammenfassend geben die bisherigen auf Kosuppression basierenden Silencing-Methoden zwar Hinweise darauf, in welchen Prozessen CDPKs eine Rolle spielen, doch Versuche isoformspezifische Funktionen zu identifizieren sind bislang, außer für NtCDPK2, erfolglos geblieben.

1.3 Chemische Inhibition

Eine Alternative zu den Silencing-Ansätzen, die eine isoformspezifische Auflösung erlauben würde, besteht in dem Einsatz von gezielten Inhibitoren für eine CDPK-Isoform. Die bislang für CDPKs verwendeten Inhibitoren, wie beispielsweise W-7, stellen allgemeine Inhibitoren für Kalzium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen dar, mit denen eine Unterscheidung der einzelnen Isoformen nicht möglich ist. Die Identifizierung von kleinen Molekülen, die einzelne Isoformen spezifisch und mit hoher Affinität inhibieren können, ist problematisch. Inhibitoren zu modellieren oder mittels Bioinformatik vorherzusagen wird dadurch erschwert, dass die Bindung von Kinase und Inhibitor von einer Vielzahl kleiner Kräfte, wie Van der Waals-Kräfte, abhängig ist, die sensitiv auf zelluläre Veränderungen reagieren. Für einige Kinasen wie Cdc28 und CDK2 sind durch den Einsatz von abwechselnder *in vitro* Aktivitätsbestimmung und Optimierung der chemischen Synthese Kinaseinhibitoren synthetisiert worden, die K_i -Werte im nanomolaren Bereich aufweisen. Trotz der hohen Affinität stellt sich bei diesen Inhibitoren die Frage nach der Spezifität. Eine Untersuchung von 28 kommerziell erhältlichen Kinaseinhibitoren *in vitro* zeigt, dass alle bis auf 2 Inhibitoren mehr als ein Zielprotein binden (Davies *et al.*, 2000).

1.4 Substratidentifizierung

Einen alternativen Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von CDPKs bieten auch biochemische Methoden zur Identifizierung von Substratproteinen. Hefe-2-Hybrid-Analysen und die Aufreinigung von Proteinkomplexen wurden verwendet, um interagierende Proteine von CDPKs zu identifizieren. *In vitro* Phosphorylierungen von Phage-Display Bibliotheken dienen der Identifizierung von Phosphorylierungs substraten. Mit der *in vitro* Phosphorylierung von Peptid-Chips werden Peptidsequenzen gesucht, die einen Hinweis auf bevorzugte Phosphorylierungsstellen geben können. Mittels bioinformatischer Methoden können Proteine, welche diese Peptidsequenzen enthalten, dann im Genom identifiziert werden. Es konnte eine wachsende Liste von *in vitro* Substraten identifiziert werden, die bislang allerdings nicht *in vivo* reproduziert werden konnte.

Eine Schwierigkeit bei *in vitro* Untersuchungen ist der hohe Hintergrund zellulärer Kinasen. Kinasen machen in Eukaryoten ungefähr 2 % des Genoms aus. Zwei Möglichkeiten wurden bislang verwendet, den Hintergrund der Kinasetests zu minimieren: räumliche Verteilung der untersuchten Proteine und im Falle von radioaktiven Kinasetests, Vorinkubation mit nicht-radioaktivem ATP. Die räumliche Trennung der Proteine in Phage-Display Bibliotheken und Protein-Chips verhindert zwar effektiv eine Fremdphosphorylierung von Substraten durch andere Kinasen, unterdrückt aber nicht die Autophosphorylierung der Kinasen. Zudem liegen viele Substrate nicht mehr in den Komplexen vor, die eventuell *in vivo* notwendig sind, um phosphoryliert zu werden. Eine Vorinkubation mit ATP hingegen unterdrückt Signale der Autophosphorylierungen. Unter Umständen kommt es dadurch aber zu Phosphorylierungen von Substratproteinen durch fremde Kinasen, die anschließend keine CDPK-Phosphorylierung mehr zulassen. Eine Lösung dieses Problems läge in der Nutzung von spezifischen Phosphatdonoren für einzelne Kinasen.

1.5 Chemisch-Genetische Methode

Die hohe Homologie, die eine Identifizierung von spezifischen Inhibitoren erschwert, bietet auch Vorteile. Durch die Mutation von Schlüsselpositionen in Kinasen können beispielsweise Kinase-inaktive Varianten erzeugt werden. Diese Schlüsselpositionen lassen sich in unbekanntem Kinasen aufgrund der hohen Homologie durch primäre Sequenzvergleiche ableiten. In der chemisch-genetischen Methode werden die Vorteile von chemischen Inhibitoren und Genetik zusammengeführt und Kinasen so mutiert, dass sie von einem vorgegebenen Inhibitor gebunden werden können (Bishop *et al.*, 2001). Dies hat den Vorteil,

dass durch die hohe Homologie der Kinasen diese Methode allgemeingültig in allen Kinasen einsetzbar ist und dass ein Inhibitor ausreichend ist, um eine Vielzahl verschiedener Kinasen zu untersuchen. Experimente mit Serin/Threonin- und Tyrosinkinase zeigten, dass die Mutation einer einzelnen Aminosäure in der ATP-Bindetasche („Gatekeeper“-Aminosäure) ausreichend war, eine inhibitorsensitive Kinase zu generieren. Die „Gatekeeper“-Aminosäure ist in allen Kinasen, die bislang untersucht wurden, eine Aminosäure mit einer großen Seitenkette. Mutationen dieser Aminosäure zu Alanin oder Glycin erzeugen eine zusätzliche Lücke in der ATP-Bindetasche. Inhibitoren, die mit großen Seitengruppen in diese Position ragen, können in die modifizierte ATP-Bindetasche binden. Wildtypkinasen werden auf diese Weise nicht inhibiert, da die „Gatekeeper“-Aminosäure hier eine Bindung des Inhibitors verhindert. Als sehr selektiver Inhibitor mit hoher Affinität für die inhibitorsensitiven Kinasen hat sich 1-Naphthyl-PP1 (4-amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthyl)pyrazolo[3.4-d]pyrimidin) herausgestellt. Der Tyrosinkinase-Inhibitor PP1 ist durch eine zusätzliche Naphthyl-Gruppe derart modifiziert worden, dass er mit hoher Affinität inhibitorsensitive Kinasen bindet. 1-NA-PP1 besitzt eine zu ATP homologe Struktur.

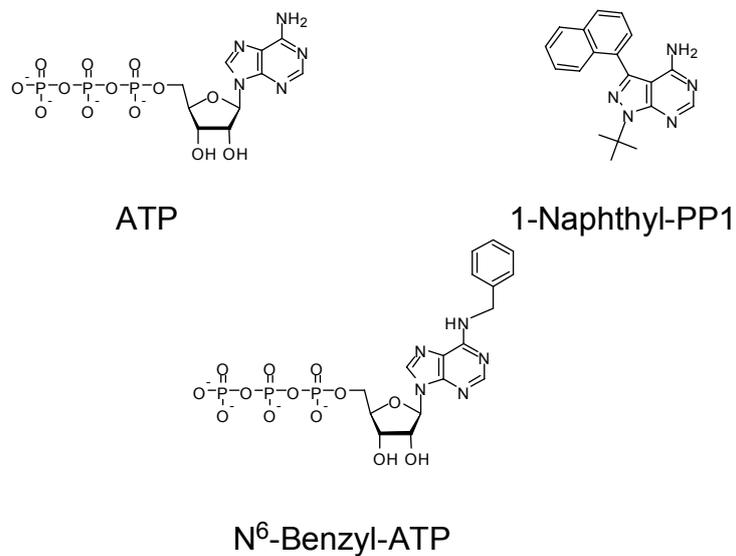


Abbildung 1-4 Chemische Strukturen von ATP, 1-Naphthyl-PP1 und N⁶-Benzyl-ATP.

Untersuchungen mit phylogenetisch weit entfernten Kinasen zeigen, dass die „Gatekeeper“-Mutation in vielen Fällen keine Veränderung von Proteinstruktur (Witucki *et al.*, 2002), Enzymaktivität (Liu *et al.*, 1998), Substratspezifität (Witucki *et al.*, 2002) und zellulärer Funktion bewirkt (Bishop *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2001). In anderen Fällen kam es hingegen zu Änderungen der Kinaseaktivität bis hin zur

Inaktivierung der Kinase (Bishop *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2003), weshalb eine vorausgehende biochemische Charakterisierung der mutierten Kinasen notwendig ist.

Ergebnisse aus den Untersuchungen von Kinase-Mutanten und chemisch-genetischen Analysen zeigen oft große Unterschiede. Mit der chemisch-genetischen Methode wurden vielen Fällen auffällige Phänotypen beobachtet, die in Mutanten nicht (Carroll *et al.*, 2001) oder in anderer Form gefunden wurden (Bishop *et al.*, 2000). Grund dafür ist vermutlich, dass in Mutanten die Zellen sehr viel Zeit haben, die fehlende Kinaseaktivität im Laufe der Entwicklung zu kompensieren. Auch induzierbare Mutanten, wie temperatursensitive Mutanten und induzierbare RNA-basierte Silencing-Ansätze führen nur sehr langsam zu Veränderungen auf Proteinebene. Für Prozesse mit schnellen Kinetiken, wie der Signaltransduktion, sind diese Veränderungen zu langsam um eine Kompensation der Kinaseaktivität zu verhindern. Temperatursensitive Mutanten haben zudem den Nachteil, dass Hitzestress nach Temperaturerhöhung zu starken sekundären Effekten führt. In Hefe werden beispielsweise 15 % aller Gene nach Hitzestress differentiell reguliert (Causton *et al.*, 2001) und in *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass nach Hitzestress ~150 von 400 untersuchten Metaboliten eine Veränderung der Konzentration zeigen (Kaplan *et al.*, 2004).

Bei der Untersuchung funktionell redundanter Kinasen, wie es für die CDPKs angenommen wird, bietet die chemisch genetische Methode den Vorteil, dass bei einer schnellen Inhibition der Kinaseaktivität der Pflanze keine Zeit bleibt, die fehlende Kinaseaktivität zu kompensieren. Die Geschwindigkeit der Inhibition ist oftmals nur diffusionsabhängig. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine chemische Inhibition der Kinaseaktivität im aktiven Zentrum weder die Zelllokalisierung noch Protein-Protein-Interaktionen, die in der Regel über die variable Region vermittelt werden und damit getrennt von der ATP-Bindetasche liegen, stört. Es ist gezeigt worden, dass Kinasen Funktionen unabhängig von ihrer Kinaseaktivität erfüllen können (Cook *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998). Durch die chemisch-genetische Methode können solche Funktionen von der Kinaseaktivität getrennt werden. Daneben ist die chemische Inhibition von Kinasen konditional, so dass unterschiedliche Funktionen von Kinasen oft auch über die Konzentration des Inhibitors einzeln analysiert werden können, wie für Cdc28 gezeigt (Bishop *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2001).

Neben der Bindung eines spezifischen Inhibitors ermöglicht die „Gatekeeper“-Mutation außerdem die Bindung des N⁶-modifizierten ATP-Analogons N⁶-Benzyl-ATP. Das

modifizierte ATP-Analogen kann in Kinasetests als Phosphatdonor eingesetzt werden. Dies ermöglicht die Phosphorylierung von Substratproteinen in einem Hintergrund von Wildtypkinasen, die das ATP-Analogen nur mit sehr viel geringerer Affinität binden.

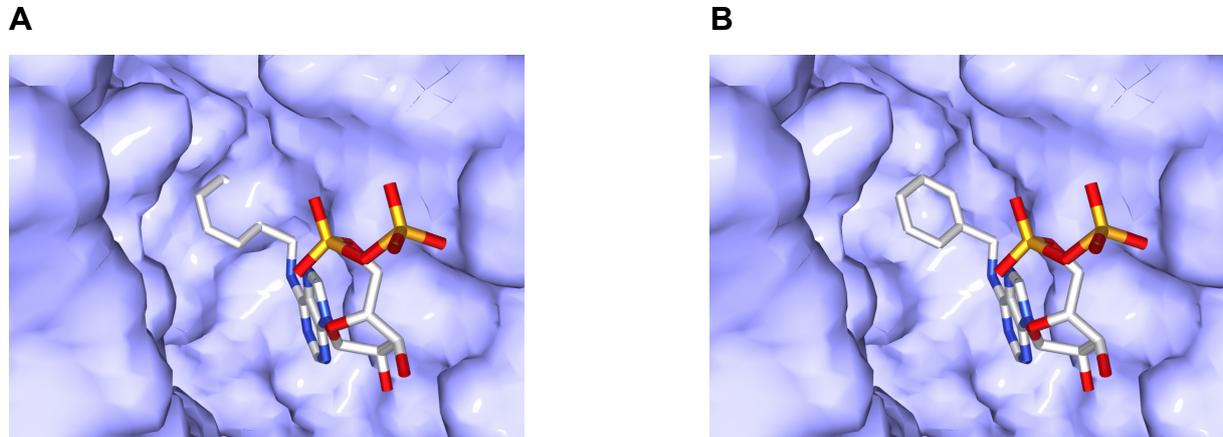


Abbildung 1-5 Oberflächendarstellung der ATP-Bindetaschen von NtCDPK2 Wildtypenzym (A) und ATP-Bindetaschenvariante (B) nach Bindung von N⁶-Benzyl-ADP. Modelle wurden erstellt durch Überlagerung der Struktur der Tyrosinkinase c-SRC (PDB ID: 1KSW) gebunden an N⁶-Benzyl-ADP mit der Sequenz von NtCDPK2 in SwissProt PDB-Viewer und anschließender Energieminimierung. Die Auswirkungen der „Gatekeeper“-Mutation auf die Oberfläche der ATP-Bindetasche wurden ebenfalls in SwissProt PDB-Viewer berechnet. Die graphischen Darstellungen wurden aus den Strukturdaten des SwissProt PDB-Viewers in POV-Ray erzeugt.

2 Zielsetzung

Durch auf Kosuppression basierte Silencing-Methoden und Gain-of-Function-Analysen wurde die mögliche biologische Rolle von nur einigen wenigen CDPKs in essentiellen Prozessen, wie Pollenschlauchwachstum (Estruch *et al.*, 1994; Moutinho *et al.*, 1998), Wurzelentwicklung (Ivashuta *et al.*, 2005) und Pathogenabwehr (Romeis *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2001) beschrieben. Bislang sind aber nur in wenigen Fällen isoformspezifische Funktionen gefunden worden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine chemisch-genetische Methode zur Analyse von CDPKs in Pflanzen zu etablieren, mit der es möglich sei, Funktionen einzelner CDPK-Isoformen zu untersuchen. Analysiert wurden die beiden homologen *A. thaliana* Isoformen AtCPK1 und AtCPK2. Die funktionelle Charakterisierung dieser beiden Isoformen ist in drei Abschnitte untergliedert.

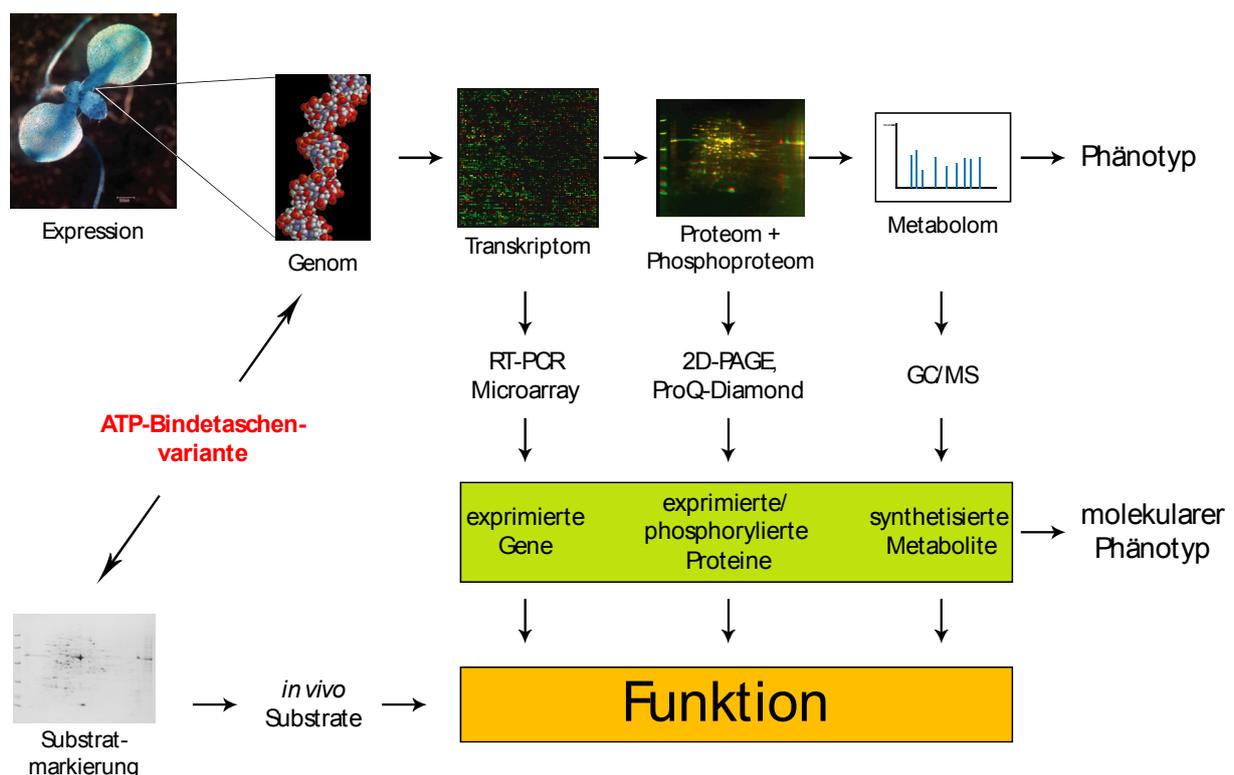


Abbildung 2-1 Versuchsschema zur chemisch-genetischen Charakterisierung von CDPK-Funktionen. CDPK-Mutantenlinien, komplementiert durch ATP-Bindetaschenvarianten, werden auf gewebespezifische und Stress-induzierte Expression und Veränderungen in Transkriptom, Proteom und Metabolom untersucht, um daraus einen molekularen Phänotyp abzuleiten. Ergänzt wird diese Untersuchung durch die Identifizierung von Substraten.

Im ersten Teil (2.1) wurden die gewebespezifische Expression und die Veränderungen nach Stressstimuli untersucht. Dazu wurden Microarray-Daten aus öffentlichen Datenbanken analysiert und für AtCPK1 und AtCPK2 mit stabilen Promotor-GUS *Arabidopsis*-Linien verglichen. Im zweiten Teil (2.2) wurden diese Ergebnisse dazu verwendet, die untersuchten Kinasen in den Geweben, in denen sie exprimiert werden, nach Stressstimuli, bei denen diese Kinasen aktiviert werden, mit Hilfe einer chemisch-genetischen Methode zu untersuchen. Dazu wurden CDPK-Mutanten selektiert und mit ATP-Bindetaschenvarianten komplementiert. Die untersuchten CDPKs wurden *in vivo* mit 1-NA-PP1 inhibiert und nach Stressstimulus mit nicht-inhibierten Kontrollpflanzen verglichen. Dabei wurden auf molekularer Ebene Veränderungen im Proteom, Metabolom und Transkriptom, sowie phänotypische Unterschiede analysiert. Im dritten Teil der Arbeit (2.3) wurde die Phosphoregulation von CDPKs näher untersucht. Dabei wurden *in vivo* Phosphorylierungsstellen von AtCPK2 bestimmt, um diese mit bereits bekannten Phosphorylierungsstellen aus den homologen Proteinen AtCPK1, NtCDPK2 und NtCDPK3 zu vergleichen. Zusätzlich wurde eine Phosphorylierungsstelle in der ATP-Bindetasche von NtCDPK2 näher charakterisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsprofile ausgesuchter CDPKs

Für die Voruntersuchungen zur chemisch-genetischen Analyse von CDPKs wurden vier CDPK-Isoformen aus *A. thaliana* ausgewählt: AtCPK1, AtCPK2, AtCPK28 und AtCPK32. Diese Isoformen wurden ausgewählt basierend auf Microarraydaten, die zeigten, dass AtCPK1, AtCPK28 und AtCPK32 durch Flagellin-Behandlung, einem Pathogen-relevanten Stress, transkriptionell induziert werden (Navarro *et al.*, 2004). Für AtCPK2 konnte diese Induzierbarkeit nicht gezeigt werden. Aufgrund der hohen Homologie zu AtCPK1 wurde sie trotzdem in die Untersuchungen mit einbezogen. Für jede der vier Isoformen waren außerdem T-DNA Insertionslinien erhältlich. Auf der Basis weiterer öffentlicher *Arabidopsis* Microarraydaten sollte aus dieser Gruppe eine Vorauswahl für die weiteren Analysen getroffen werden. Daten über die Expression dieser CDPKs in verschiedenen Pflanzengeweben wurden aus der öffentliche Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) der ETH Zürich bezogen. Im Weiteren wurde die Expression von AtCPK1 und AtCPK2 unter verschiedenen Stressstimuli betrachtet.

3.1.1 Expression in verschiedenen Pflanzengeweben

Die Analyse der GENEVESTIGATOR Datenbank beruht auf Experimenten mit dem Ökotyp Col-0, in dem sich auch die zur Verfügung stehenden T-DNA Insertionslinien befanden. Für jedes Gewebe wurden zwischen 2 und 576 Microarray Chips ausgewertet. Die Daten sind in Abbildung 3-1 graphisch dargestellt. Obwohl die für die Microarrays verwendeten Oligomere für AtCPK1 und AtCPK2 laut Angaben der Datenbank gegenseitig erkannt werden, zeigten sich Unterschiede in der gewebespezifischen und stressinduzierten Expression.

Dies deutet auf eine eher geringe Kreuzaktivität hin. Daher wurden die beiden Isoformen für diese Analyse getrennt betrachtet.

Von den vier untersuchten CDPKs weist AtCPK2 die geringste Expressionsstärke auf und ist spezifisch in Pollenkörnern und Wurzeln lokalisiert. In den übrigen Geweben bleibt die Expressionsstärke unterhalb der Hintergrundsignale. Die Expression in Staubblättern umfasst auch die in den Staubblättern enthaltenen Pollen. Daneben wird von den vier Isoformen nur noch AtCPK32 ebenfalls in Pollenkörnern exprimiert, dies allerdings 12-fach höher als AtCPK2. AtCPK32 zeigt eine sehr starke Expression in allen Geweben und scheint tendenziell eher in älteren und seneszenten Blättern exprimiert zu sein. Dies gilt auch für

AtCPK28 und könnte auf eine Funktion in der Seneszenz hinweisen. Die Expression von AtCPK28 ist der von AtCPK32 sehr ähnlich, zeigt allerdings eine deutlich geringere Expression in Wurzeln und Blütenstand. Die Expression von AtCPK1 ist in Wurzeln, Stamm und Hypokotyl leicht erhöht, in seneszenten Blättern im Vergleich zu jungen Blättern leicht verringert.

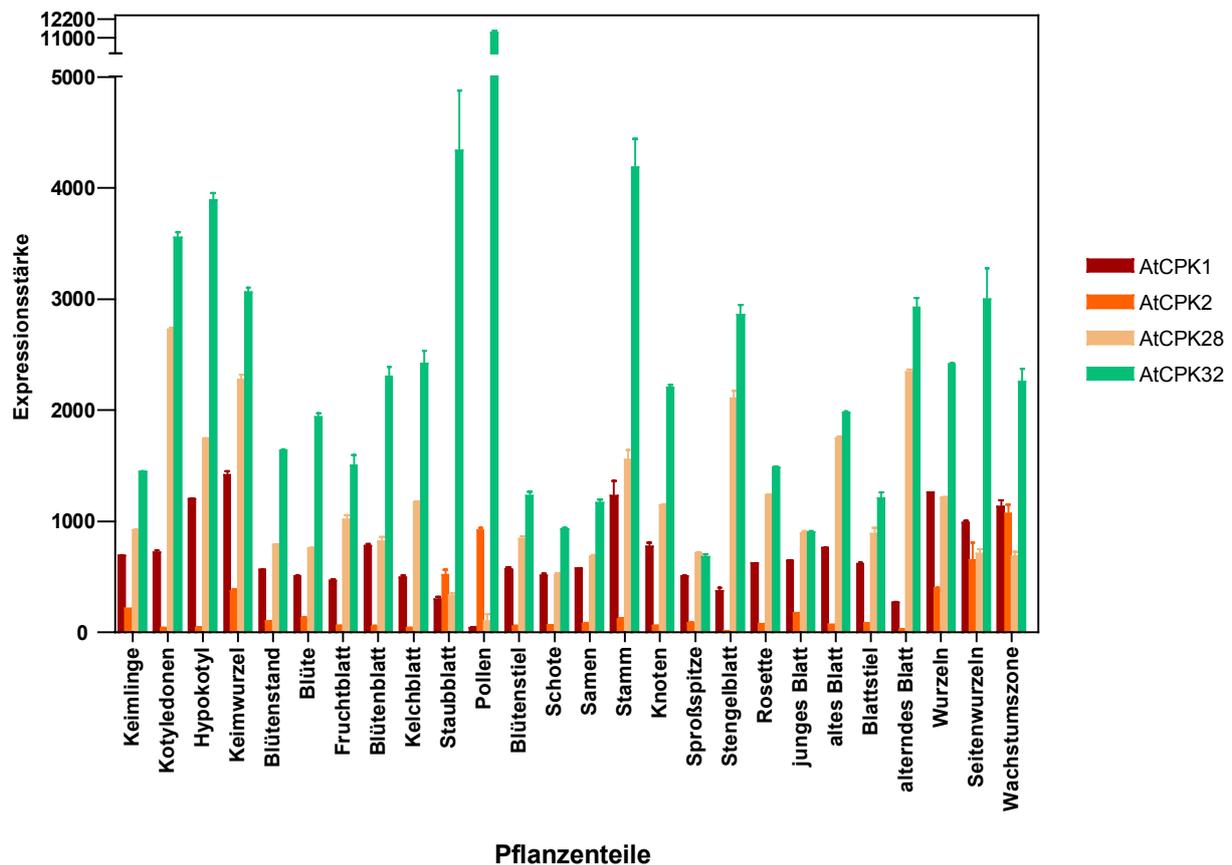


Abbildung 3-1 Gewebespezifische Expression von AtCPK1, AtCPK2, AtCPK28 und AtCPK32 in *Arabidopsis Col-0*. Microarraydaten aus der Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) der ETH Zürich wurden bezüglich der gewebespezifischen Expression von AtCPK1, AtCPK2, AtCPK28 und AtCPK32 ausgewertet und die Expressionsstärke als Histogramm dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen mehrerer Microarrayexperimente an.

Aufgrund der sehr spezifischen Lokalisation von AtCPK2, wurde diese Isoform für weitere Untersuchungen ausgewählt. Da AtCPK1, AtCPK28 und AtCPK32 in fast allen Geweben exprimiert waren, wurde AtCPK1 als Beispiel einer ubiquitär exprimierten CDPK ausgewählt. AtCPK1 und AtCPK2 sind die am nächsten verwandten Homologen der CDPK-Untergruppe I, mit einer Identität von 77,8 % auf Proteinebene. Beide Isoformen sind zudem Orthologe von NtCDPK2 aus *N. tabacum*. NtCDPK2 wird durch abiotischen und biotischen Stress induziert (Romeis *et al.*, 2001) und ist bereits detailliert biochemisch und funktionell

charakterisiert worden. So könnte für eine biochemische Charakterisierung von ATP-Bindetaschenmutationen in CDPKs zunächst NtCDPK2 als Modellenzym eingesetzt werden.

3.1.2 Regulatorische Elemente in der genomischen Region von AtCPK2

Durch eine bioinformatische Analyse der PLACE-Datenbank (Higo *et al.*, 1999) wurden Bindestellen für Transkriptionsfaktoren gesucht, die für die zellspezifische Lokalisation von AtCPK2 verantwortlich sein könnten.

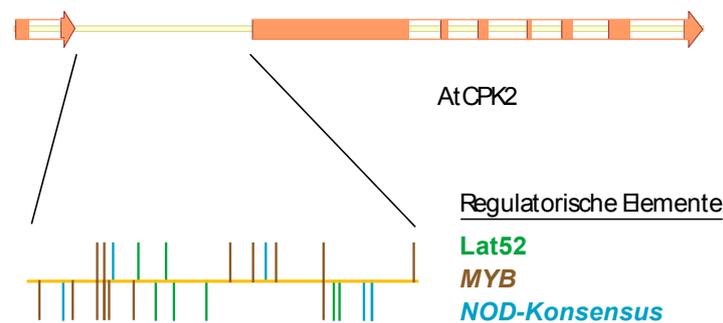


Abbildung 3-2 Regulatorische Elemente in der genomischen Region um AtCPK2. Eine bioinformatische Analyse der PLACE-Datenbank (Higo *et al.*, 1999) ergab drei regulatorische Elemente, die in Anzahl und gewebespezifischer Expression bekannter Zielgene interessant erschienen. Dies sind ein regulatorisches Element aus *Lat52*, einem Pollen-exprimierten Gen aus Tomate, eine regulatorischen Sequenz aus Wurzelknöllchen-exprimierten *Nodulin*-Genen und Bindestellen für MYB-Faktoren, die eine Rolle in der Trichomen-Expression einiger Gene spielen.

Aufgrund der kurzen Konsensussequenzen von regulatorischen Elementen, in der Regel 4-6 Basenpaare, konnten eine Reihe von potentiellen Bindestellen im Promotorbereich von AtCPK2 identifiziert werden. Davon waren drei regulatorische Elemente wegen ihrer hohen Abundanz in der Region und der gewebespezifischen Expression bekannter Zielgene von besonderem Interesse. Ein Element war ein regulatorisches Element aus der Promotorregion von *Lat52*. Das *Lat52*-Gen aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) kodiert für ein Cysteinereiches Protein, das primär während der Pollenreifung in der vegetativen Zelle transkribiert wird. Eine Promotor-GUS Fusion mit der *Lat52*-Promotorregion beschränkte die GUS-Expression in *A. thaliana* auf Pollenkörner (Twell *et al.*, 1990; Bate und Twell, 1998), was vermuten lässt, dass die gleichen Mechanismen für die pollenspezifische Expression in Tomate und *Arabidopsis* wirken. Dieses Element könnte somit eine Rolle in der pollenspezifischen Expression von AtCPK2 spielen.

Als zweites regulatorisches Element wurden Bindestellen für MYB-Transkriptionsfaktoren identifiziert. Einige MYB-Transkriptionsfaktoren regulieren die Entwicklung von Trichomen. Dazu gehören der R2R3 Transkriptionsfaktor GLABRA1 (Oppenheimer *et al.*, 1991), und die beiden kleinen MYB Transkriptionsfaktoren TRYPTICHON und CAPRICE (Wada *et al.*, 1997; Schellmann *et al.*, 2002).

Die Nod-Konsensus Bindestelle ist in der Promotorregion von Nodulinen identifiziert worden. Noduline sind Proteine, die in symbiotischen Interaktionen mit Wurzelknöllchenbakterien in Wurzelhaaren exprimiert werden (Sandal *et al.*, 1987). *A. thaliana* zeigt diese bakteriellen Symbiosen nicht, allerdings können auch im Genom von *Arabidopsis* Nodulin-homologe Proteine identifiziert werden.

3.1.3 Transkriptionelle Regulation nach abiotischem und biotischem Stressstimulus

Die Induktion der Genexpression von NtCDPK2 nach abiotischem und biotischem Stress steht in enger Korrelation zur Funktion von NtCDPK2 in der Integration beider Stresse (Ludwig *et al.*, 2005). Die Ergebnisse von Transkriptionsanalysen nach verschiedenen abiotischen Stressstimuli sind für AtCPK1 und AtCPK2 in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Microarraydaten stammen aus den Experimenten von AtGenExpress (D. Weigel, M. Schmid, and J. Lohmann, unveröffentlicht) und wurden aus der Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) bezogen. Pflanzen des Ökotyps Col-0 wurden auf MS-Flüssigmedium aufgezogen und unter Langtagbedingungen (Photoperiode: 16 h Licht, 8 h Dunkelheit; Temperatur: 24 °C, Luftfeuchte: 50 %; Lichtintensität: 150 μ Einstein/cm²) inkubiert. Die Stressapplikation wurde nach 16 Tagen wie in Tabelle 3-1 beschrieben durchgeführt.

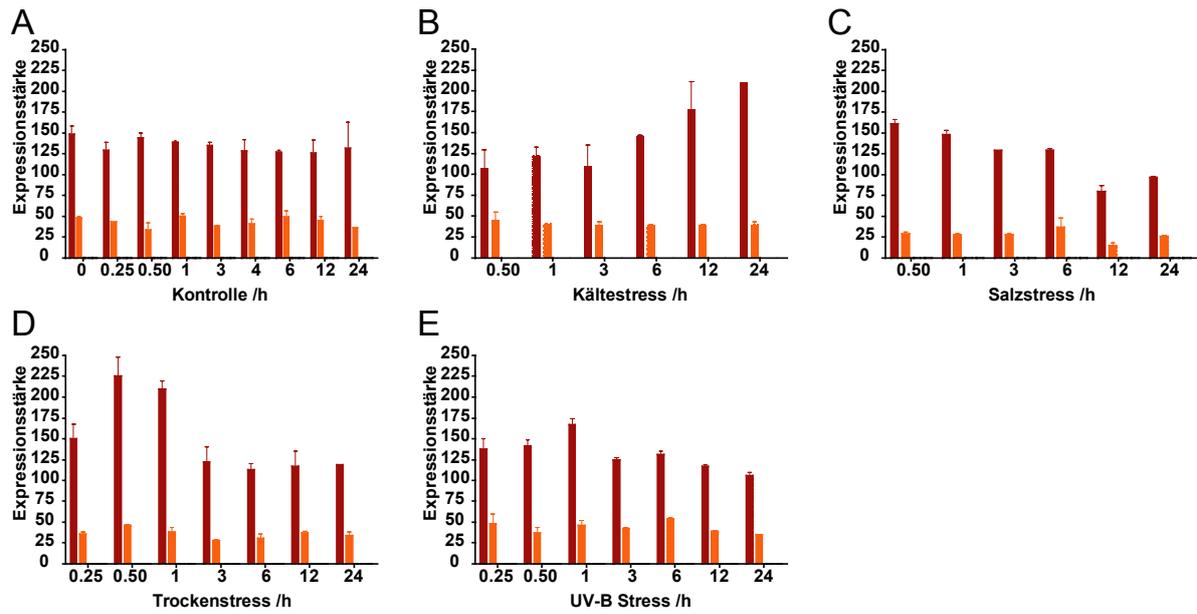
Tabelle 3-1 Übersicht über die Hybridisierungs-Experimente nach abiotischem Stress, die in Abbildung 3-3 dargestellt sind. Die Versuchsbeschreibungen zu den Experimenten von AtGenExpress (D. Weigel, M. Schmid, and J. Lohmann, unveröffentlichte Daten) stammen aus der Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004).

Abiotischer Stress	Stressapplikation
Kältestress	Inkubation der Pflanzen bei 4 °C auf Eis
Osmotischer Stress	Zugabe von 300 mM Mannitol ins Medium
Salzstress	Zugabe von 150 mM NaCl ins Medium
Trockenstress	Trocknen im Luftstrom unter einer Sterilbank, bis die Pflanzen 10 % des Frischgewichts verloren hatten
Genotoxischer Stress	Zugabe von 1,5 μ g/mL Bleomycin und 22 μ g/mL Mitomycin ins Medium
Oxidativer Stress	Zugabe von 10 μ M Methyl-Viologen

UVB-Stress	Bestrahlen für 0,25 h im UV-B Lichtfeld bestehend aus sechs Philips TL 40 W/12 UV Leuchtstoffröhren (λ max. 310 nm, halbe Bandweite 40 nm, Flussrate 7 W/m ²) gefiltert durch 3 mm Transmissions-Ausschlussfilter der WG-Serie (WG295, WG305, and WG327; Schott, Mainz).
Wundstress	Verwundung der Blätter mit Nadeln

In einem Zeitkurs von 24 Stunden wurden zu den in Abbildung 3-3 angegebenen Zeitpunkten Wurzel- und oberirdisches Pflanzenmaterial getrennt geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Es wurden zwei biologische Wiederholungen pro Stressbehandlung analysiert. Die Transkriptmengen wurden durch Hybridisierung mit dem Affymetrix ATH1 ‚full genome‘ Chip bestimmt und mit der Software GCOS normalisiert.

Wurzel



Oberirdische Pflanzenteile

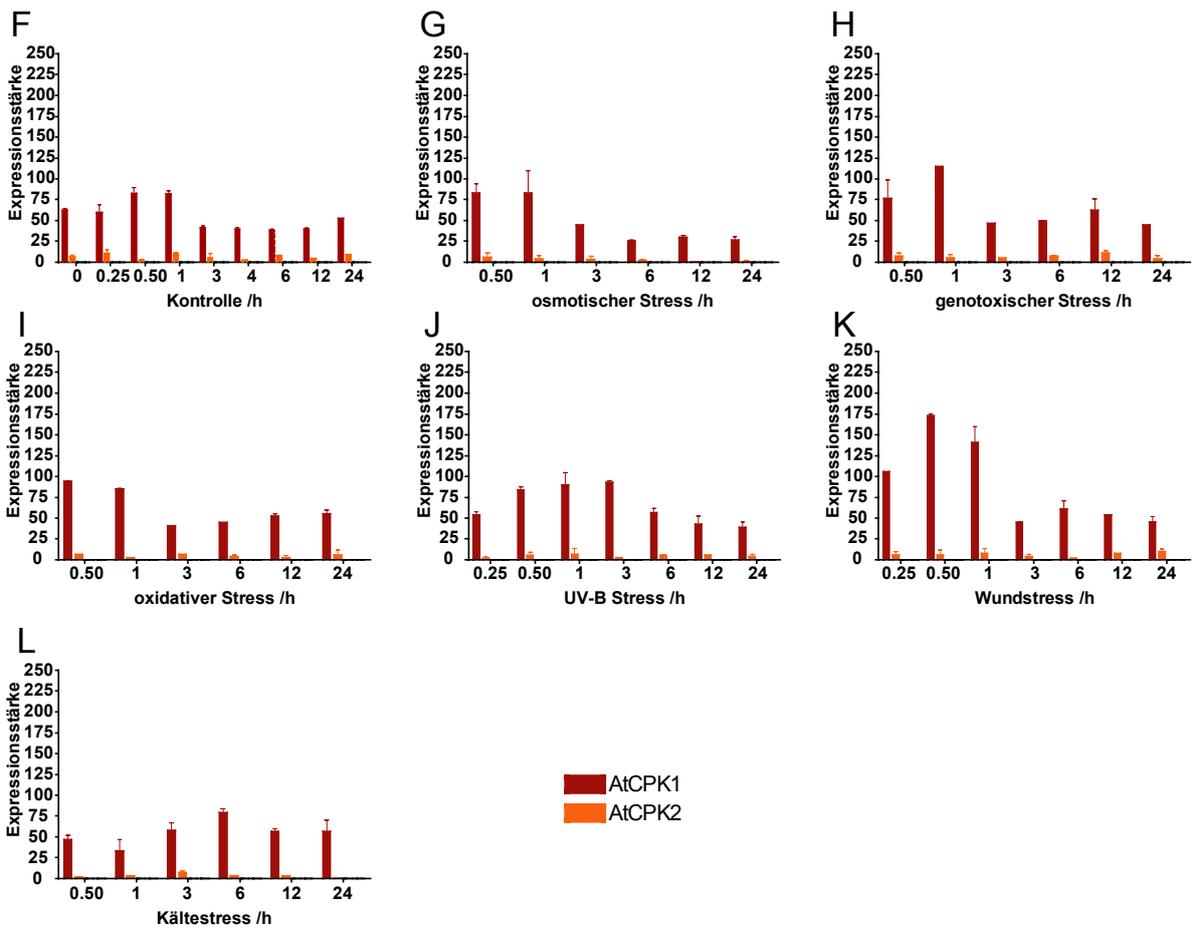


Abbildung 3-3 Veränderungen der Expression von AtCPK1 und AtCPK2 nach abiotischen Stressstimuli. *Arabidopsis* Pflanzen vom Ökotyp Col-0 wurden nach 16 Tagen Aufzucht auf MS-Flüssigmedium verschiedenen abiotischen Stressstimuli ausgesetzt (s. Tabelle 3-1). Über einen Zeitkurs von 24 Stunden wurden

Wurzeln und oberirdisches Pflanzenmaterial getrennt geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Transkriptmengen wurden durch Hybridisierung mit Affymetrix ATH1 „full genome“ chips quantifiziert. Die Microarraydaten wurden aus der Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) aus Experimenten von ATGenExpress (D. Weigel, M. Schmid, and J. Lohmann, unveröffentlicht) bezogen. Die Expressionsstärken von AtCPK1 und AtCPK2 sind als Histogramme dargestellt. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von zwei Experimenten an.

Für AtCPK1 kann in der Wurzel sowohl nach Kältestress als auch nach Trockenstress ein mehr als doppelter Anstieg der Expressionsstärke beobachtet werden (Abbildung 3-3 B, D). Die Kinetiken dieser transkriptionellen Regulationen sind bei beiden Stressstimuli sehr unterschiedlich. Bei der Änderung nach Kältestress handelt es sich um einen progressiven Anstieg. Die Transkriptlevel steigen 24 Stunden nach Beginn des Kältestresses noch immer an. Beim Trockenstress kommt es zu einem sehr starken transienten Anstieg der Expression, der etwa 2 Stunden lang anhält. Danach sind die Transkriptlevel wieder auf dem Stand wie vor dem Stressstimulus. In den oberirdischen Blatteilen kommt es vor allem nach Verwundung zu einer starken, transienten fast 3-fachen Erhöhung der Expression von AtCPK1, vergleichbar mit der Regulation nach Trockenstress (Abbildung 3-3 K). AtCPK2 zeigt im Vergleich dazu keinerlei Induktion nach abiotischem Stress.

Die Ergebnisse von Transkriptionsanalysen nach biotischem Stress sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Die Microarraydaten und die Dokumentationen der Experimente A, B, D und E stammen aus der Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004). Für das Experiment mit Syringolin (K. Michel und R. Dudler; unveröffentlicht) wurden Pflanzen im 4-Blatt-Stadium mit Syringolin behandelt. Für die Behandlung mit 6-Benzyl-Adenin (Wolfram Brenner, FU Berlin; nicht veröffentlicht) wurden hydroponische Kulturen nach 6 Tagen für 15 Minuten mit 6-Benzyl-Adenin, gelöst in verdünnter KOH-Lösung, inkubiert. Krabben-Chitin wurde hydroponischen Kulturen nach 14 Tagen zu 100 µg/mL zugegeben (Ramonell *et al.*, 2005). Für das Cycloheximid-Experiment wurden Keimlinge im 2-Blatt-Stadium für 3 Stunden mit 10 µM Cycloheximid behandelt. Im Experiment mit Syringolin wurde die Gesamt-RNA aus den Primärblättern extrahiert, in den anderen Experimenten aus ganzen Keimlingen. Die Hybridisierung wurde jeweils mit Affymetrix ATH1 „full genome“ Chips durchgeführt. Die Experimente C und F wurde durchgeführt von M. Bartsch, MPIZ Köln. Pflanzen wurden vier Wochen unter Kurztagbedingungen (Photoperiode: 10 h Licht, 14 h Dunkelheit; Temperatur: 23 °C, Luftfeuchte: 65 %; Lichtintensität: 150-200 µEinstein/m²s) auf Erde kultiviert. Zur Inokulation der Blätter mit *Pseudomonas syringae* Pathovar tomato (*Pst*) DC3000 wurde eine Bakterienlösung in Blätter infiltriert (Feys *et al.*,

2005). Blattmaterial wurde zu den in Abbildung 3-4 angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamt-RNA aus den Pflanzen extrahiert.

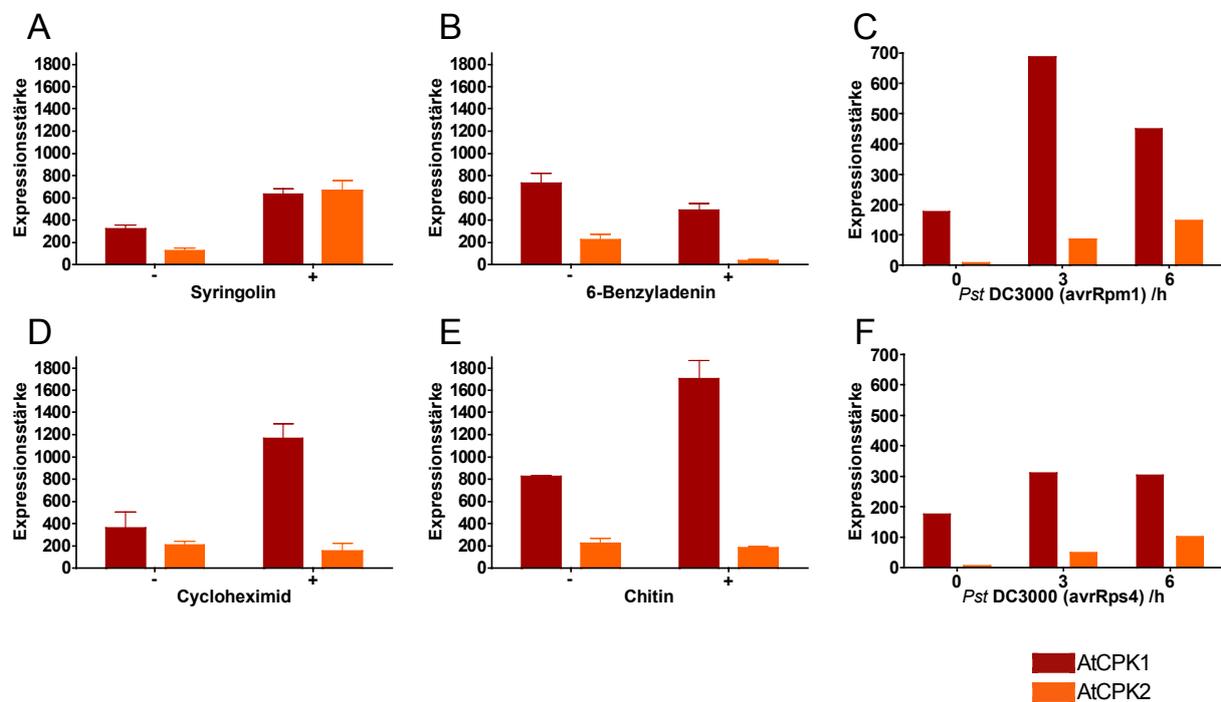


Abbildung 3-4 Expressionsveränderungen von AtCPK1 und AtCPK2 nach Behandlung mit Pathogenen und chemischen Elizitoren. Die Daten stammen aus verschiedenen Experimenten der Datenbank GENEVESTIGATOR (A, B, D, E) (Zimmermann *et al.*, 2004) oder von M. Bartsch, MPIZ Köln (C, F). Gezeigt sind die Expressionsstärken mit (+) und ohne (-) Elizitor/Chemikalien-Behandlung. A) Induktion der Transkription in Primärblättern von Pflanzen im 4-Blatt-Stadium nach Inkubation mit Syringolin. B) Induktion in 6 Tage alten hydroponischen Kulturen nach 15 Minuten Inkubation mit 6-Benzyladenin. C) Induktion in 4 Wochen alten Pflanzen nach Inokulation mit *Pst* DC3000 (avrRpm1). D) Induktion in Keimlingen im 2-Blatt-Stadium nach 3 Stunden Inkubation mit Cycloheximid. E) Induktion in 14 Tage alten hydroponischen Kulturen nach Inkubation mit Krabben-Chitin. F) Induktion in 4 Wochen alten Pflanzen nach Inokulation mit *Pst* DC3000 (avrRps4).

Syringolin ist ein zyklischer Peptidelizitor, der von *Pseudomonas syringae* pv *syringae* sekretiert wird. In Reis führt dieses Peptid zu einer Transkriptakkumulation von Genen, die in der Pflanzenabwehr beteiligt sind (Wäspi *et al.*, 1998). Nach Syringolin-Behandlung steigt die Transkriptmenge von AtCPK2 um mehr als das 5-fache an. AtCPK1 zeigt eine Verdopplung der Transkriptmenge.

Chitin ist ein Hauptbestandteil der pilzlichen Zellwand und des Exoskeletts von Insekten. Es wird von Pflanzen als genereller Pathogenelizitor (PAMP: pathogen-associated molecular pattern) erkannt und induziert die Pathogenabwehr (Ramonell *et al.*, 2005). Chitin führt in

AtCPK1 zu einer Verdopplung der Transkriptmenge. AtCPK2 zeigt hier keine signifikante Veränderung.

6-Benzyl-Adenin ist ein Wachstumsregulator und führt sowohl in AtCPK1, als auch in AtCPK2 zu einer Verringerung der Transkriptmenge, bei AtCPK2 sogar um das 6-fache.

Cycloheximid ist ein Inhibitor der Translation. Nach Cycloheximid-Inkubation erhöht sich die Transkriptmenge von AtCPK1 um das 3-fache. AtCPK2 zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Die Bakterienstämme *Pst* DC3000 (avrRpm1) und *Pst* Dc3000 (avrRps4) tragen die Avirulenzgene avrRpm1 und avrRps4, die in dem Ökotyp Col-0 nach Gen-für-Gen Interaktion eine HR induzieren. Die Expressionsstärke von AtCPK1 wird in beiden Fällen leicht, 1,7-fach bzw. 4-fach, erhöht. Die Expression von AtCPK2 wird nach Inokulation mit beiden Bakterienstämmen 13-fach bzw. 19-fach induziert.

3.1.4 Herstellung und Analyse von Promotor-GUS Linien

Während die bisher aufgeführten Microarraydaten einen Hinweis auf gewebespezifische Expression und Regulation von AtCPK1 und AtCPK2 geben, lassen diese Daten mit Ausnahme der Expression in Pollenkörnern (Honys und Twell, 2003) kaum Aussagen bezüglich der zellspezifischen Expression zu. Um die Expression von AtCPK1 und AtCPK2 auf zellulärer Ebene näher zu untersuchen und die Induktion nach den beschriebenen Stresstimuli zu verifizieren, wurden stabile Promotor-GUS Linien von AtCPK1 und AtCPK2 in *A. thaliana* Col-0 generiert.

Als Promotorregion wurde bei beiden Genen die jeweils 1 kb große 5'-Region bis hin zum nächsten Gen ausgewählt. Die Expression der 5'-gelegenen Gene ist durch cDNA Klone und Tiling arrays bestätigt worden (http://atensembl.Arabidopsis.info/Arabidopsis_thaliana_TIGR/). Tiling Arrays sind Microarrays, die Oligomere für das gesamte Genom enthalten. Somit kann auch die Expression nichtkodierender Bereiche untersucht werden.

Die Promotorregionen von AtCPK1 und AtCPK2 wurden vor das *E. coli uidA* (β -Glucuronidase (GUS))-Gen kloniert. Die Konstrukte wurden in *A. tumefaciens* transformiert. Um die Funktionalität der Promotor-GUS Konstrukte zu testen, wurden diese zunächst in *N. benthamiana* transient exprimiert. Dazu wurden *A. tumefaciens* Stämme, welche die entsprechenden Konstrukte trugen, in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert. Nach dreitägiger Inkubation wurden Blattscheiben geerntet und die Expression von AtCPK1 und AtCPK2 mittels GUS-Färbung nachgewiesen. Im infiltrierten Bereich konnte eine flächige GUS-

Expression von beiden Konstrukten gezeigt werden. Ein entsprechendes Kontrollkonstrukt ohne Promotor zeigte keine Expression (Daten nicht gezeigt).

Nach stabiler Transformation der Konstrukte in *A. thaliana* Col-0 und der Etablierung homozygoter Linien wurden die Promotorkonstrukte in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze und unter verschiedenen Stressesstimuli untersucht. Es wurden drei homozygote Promotor-GUS Linien für AtCPK1 und zwei für AtCPK2 selektioniert und analysiert. Alle Linien eines Konstrukts zeigten ein vergleichbares Expressionsmuster und somit ist jeweils eine Linie, MB7.4.3 für P_{AtCPK1}::GUS und MB1.6.3 für P_{AtCPK2}::GUS, stellvertretend in den jeweiligen Abbildungen gezeigt. Für die Untersuchung der jungen Entwicklungsstadien wurden die Pflanzen auf Platte herangezogen, für die älteren Entwicklungsstadien wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen sechs Wochen im Gewächshaus kultiviert. Keimlinge und Pflanzenteile in verschiedenen Entwicklungsphasen wurden über Nacht bei 37 °C in GUS-Färbelösung inkubiert.

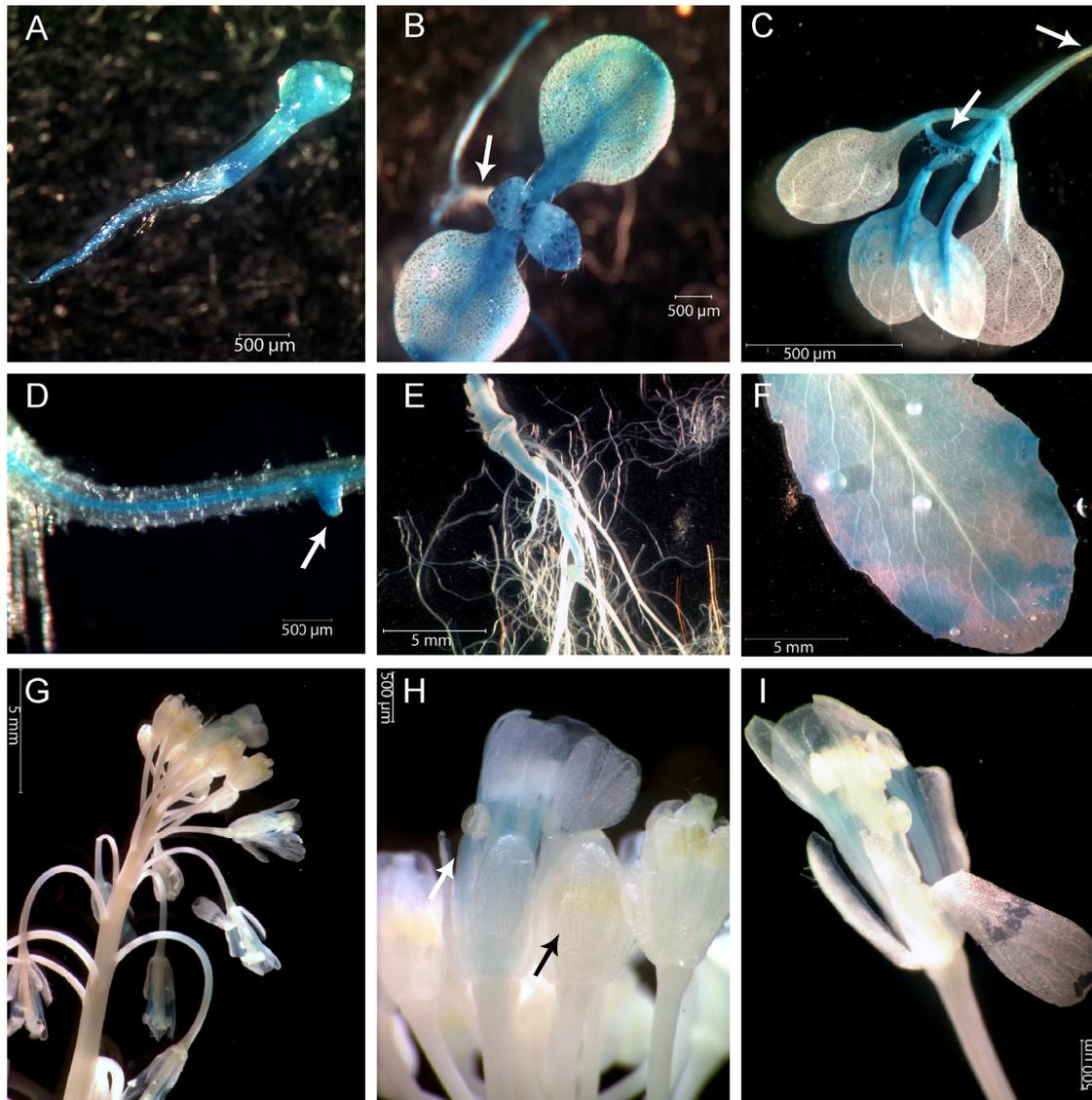


Abbildung 3-5 Keimlinge und Pflanzenteile der *Arabidopsis*-Linie MB7.4.3 ($P_{AtCPK1}::GUS$) nach histochemischer GUS-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstadien. Keimlinge und Pflanzenteile wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und über Nacht gefärbt. Keimlinge in A) und B) wurden auf Platten mit Festmedium gezogen, die übrigen Pflanzen wuchsen bei Langtagbedingungen im Gewächshaus. A)-C) Keimlinge nach 2 Tagen, 1 Woche und 2 Wochen. D) Primärwurzel nach einer Woche. E)-I) Pflanzenteile nach 6 Wochen. E) Wurzel. F) Rosettenblatt. G)-I) Blütenstand. Größenskalen sind in den Einzelbildern als Balken angegeben.

Die Expression von AtCPK1 ist bereits in Keimlingen zwei Tage nach Keimung erkennbar (Abbildung 3-5A). In späteren Entwicklungsstadien konzentriert sich die Expression in den oberirdischen Pflanzenteilen vor allem auf neu entstehende Blätter und Blattstiele. Im Verlaufe der Reifung der Blätter verringert sich die Expression auf die Blattbasis. Zum Teil verbleibt eine diffuse Färbung in älteren Blättern (Abbildung 3-5 B-C, F). Im Hypokotyl ist keine Expression detektierbar (Abbildung 3-5 B-C). In der Wurzel konzentriert sich die

Expression auf den Zentralzylinder der Wurzel und Knospen neu entstehender Seitenwurzeln (Abbildung 3-5 D, E). Im Blütenstand beschränkt sich die Expression von AtCPK1 auf das Filament der Staubblätter. Hier setzt die Expression erst ein, wenn sich die Blüte bereits geöffnet hat (Abbildung 3-5 H).

Um stress- oder pathogenabhängige Veränderungen der Expression von AtCPK1 zu untersuchen, wurden 12 Tage alte Pflanzen der Promotor-GUS Linie MB7.4.3 24 Stunden nach Kältestress oder Infektionen mit biotrophen und nekrotrophen Pathogenen mikroskopisch analysiert. Es konnte im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen weder ein verändertes Expressionsmuster noch eine veränderte Expressionsstärke festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Für eine quantitative Auswertung unter dem Mikroskop hätte es allerdings auch massiver Veränderungen bedurft, um beobachtet werden zu können.

Zusammenfassend korrelieren die Expressionsdaten des $P_{AtCPK1}::GUS$ -Konstrukts mit den Ergebnissen der Transkriptanalysen von Microarrays. Allerdings gibt es Unterschiede im Bereich des Blütenstandes, wo anhand der Microarraydaten eine ubiquitäre Expression vorzuliegen scheint und wo sich die Expression gemäß den Promotor-GUS Konstrukten auf die Filamente der Staubblätter konzentriert. Im Hypokotyl, wo AtCPK1 gemäß der Microarraydaten exprimiert sein soll, ist keine Expression in den Promotor-GUS Konstrukten erkennbar. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es neben dem hier analysierten 5'-gelegenen Promotorbereich in den Introns oder im 3' Bereich noch weitere cis-regulatorische Elemente geben könnte, die für diese differenzierte Expression verantwortlich sind. Entsprechende RNA-Analysen der betreffenden Pflanzengewebe wären notwendig, um die Frage zu klären, ob AtCPK1 in diesen Geweben tatsächlich exprimiert wird.

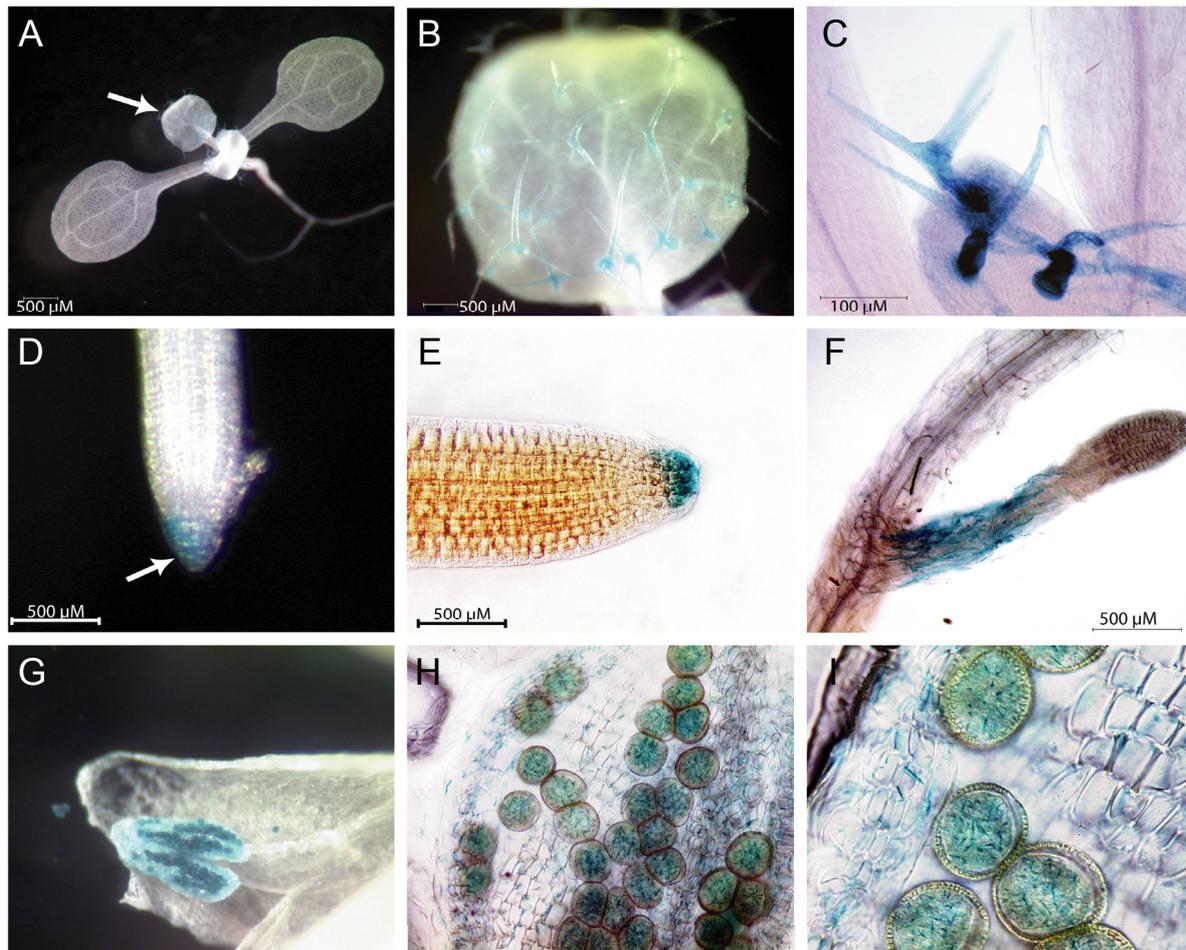


Abbildung 3-6 GUS-gefärbte Keimlinge und Pflanzenteile der *Arabidopsis*-Linie MB1.6.3 ($P_{AtCPK2}::GUS$) in verschiedenen Entwicklungsstadien. Keimlinge und Pflanzenteile wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und über Nacht gefärbt. Keimlinge in A) bis F) wurden auf Festmedium gezogen, die übrigen Pflanzen wuchsen bei Langtagbedingungen im Gewächshaus. A)-F) Keimlinge 1 Woche. B)-C) Trichomen. D)-E) Wurzelspitze. F) Seitenwurzel. G) Staubblätter. H)-I) Pollenkörner. Größenskalen sind in den Einzelbildern angegeben.

Die Expression von AtCPK2 beginnt etwa 1 Woche nach Keimung mit dem Auftreten der Trichome auf den ersten Blättern (Abbildung 3-6 A). Bis zum Rosettenstadium ist die Expression beschränkt auf Trichome (Abbildung 3-6 A-C), Wurzelspitze (Abbildung 3-6 D-E) und Wurzelhaare (Abbildung 3-6 F). In blühenden Pflanzen findet sich zudem eine Expression in reifen Pollenkörnern (Abbildung G-I). Ähnlich wie in AtCPK1 fällt der Zeitpunkt der Expression in den Pollenkörnern mit der Öffnung der Blüte zusammen (Daten nicht gezeigt).

Auch die AtCPK2 Promotor-GUS Linie MB1.6.3 zeigte nach Pathogeninfektion keine Veränderung des Expressionsmusters.

Die Expression in den Pollenkörnern war bereits aus den Microarraydaten bekannt und konnte hier bestätigt werden. Die spezifische Expression in Trichomen, Wurzelhaaren und der Wurzelspitze ist hier erstmals beschrieben. Zwar konnte aus den Microarrayexperimenten eine Lokalisation von AtCPK2 in Keimlingen, jungen Blättern und Wurzeln abgeleitet werden, allerdings ohne eine zellspezifische Auflösung. Die Promotor-GUS Linien konnten die Expressions- und Lokalisationsdaten der Microchip-basierten Transkriptionsanalysen signifikant erweitern.

3.2 Chemisch-genetische Analyse

3.2.1 Identifizierung der „Gatekeeper“-Aminosäure

Die chemisch-genetische Methode ist bereits mit Kinasen aus Hefe und Mensch durchgeführt worden. Dabei hat sich gezeigt, dass etwa 30 % der untersuchten Kinasen nach Mutation der „Gatekeeper“-Aminosäure keine Kinaseaktivität oder biologische Funktion mehr gezeigt haben (Zhang *et al.*, 2005). Um die Auswirkung dieser Mutation auf CDPKs zu untersuchen, wurde die biochemisch detailliert charakterisierte Isoform NtCDPK2 als Modellenzym verwendet. Anhand dieser Experimente sollten die Auswirkungen der „Gatekeeper“-Mutation auf die Kinaseaktivität, die Substratspezifität und das Bindungsverhalten gegenüber ATP-Analogon und Inhibitor untersucht werden.

Um die „Gatekeeper“-Aminosäure, die verantwortlich ist für die Inkompatibilität zwischen Wildtypkinasen und N⁶-modifizierten Nukleotid-Analoga, zu identifizieren, wurde zunächst ein Vergleich der Proteinsequenzen mit Kinasen durchgeführt, die bereits modifiziert worden waren (Abbildung 3-7).

β-Faltblatt	β2			β3					β5			
Position in NtCDPK2	130	131	132	147	148	149	150	151	192	193	194	195
c-Src	E	V	W	V	A	I	K	T	Y	I	V	T
Fyn	E	V	W	V	A	I	K	T	Y	I	V	T
v-erbB	T	V	Y	V	A	I	K	E	Q	L	I	T
CDK2	V	V	Y	V	A	L	K	K	Y	L	V	F
Cdc28	V	V	Y	V	A	L	K	K	Y	L	V	F
KIN28	V	V	Y	I	A	I	K	E	N	L	V	I
CaMKIIα	V	V	R	Y	A	A	K	I	Y	L	V	F
Fus3	V	V	C	V	A	I	K	K	Y	I	I	Q
Don3	T	V	Y	V	A	I	K	Q	W	I	I	M
AtCPK1	T	T	F	S	I	A	K	R	H	L	V	M228
AtCPK2	T	T	F	S	I	S	K	R	H	L	V	M264
NtCDPK2	T	T	F	S	I	A	K	R	H	V	V	M195
Cdc5	R	C	F	F	A	A	K	T	Y	I	L	L
MEKK1	S	C	Y	M	A	V	K	Q	N	L	F	I
GRK2	E	V	Y	Y	A	M	K	Q	S	E	I	L
Pto	K	V	Y	V	A	L	K	R	I	L	I	Y
APH(3')-IIIa	K	V	Y	L	A	L	K	K	N	L	L	M

Abbildung 3-7 Vergleich von Proteinsequenzen zur Bestimmung der „Gatekeeper“-Aminosäure. Aminosäurepositionen aus den β-Faltblättern 2, 3 und 5 von AtCPK1, AtCPK2 und NtCDPK2 wurden mit Kinasen verglichen, die bereits durch eine Mutation der „Gatekeeper“-Aminosäure (orange) modifiziert worden waren.

Einige der Kinasen haben dabei ihre Kinaseaktivität behalten (hellgrün), bei anderen (hellrot) waren zusätzliche Mutationen (rote Schrift) zur Wiederherstellung der Kinaseaktivität notwendig. Vier der dargestellten Aminosäuren (dunkelgrün) reichen direkt in die ATP-Bindetasche. Auffällige Abweichungen in den CDPKs von der Konsensussequenz sind in gelb dargestellt. Modifiziert nach Zhang *et al.* (2005).

In allen CDPKs handelt es sich bei der „Gatekeeper“-Aminosäure um ein Methionin. Es konnte gezeigt werden, dass neben der „Gatekeeper“-Aminosäure vier weitere Aminosäuren, deren Seitenketten in die ATP-Bindetasche reichen, einen Einfluss auf die Kinaseaktivität der ATP-Bindetaschenvarianten haben (Zhang *et al.*, 2005). Diese vier Aminosäuren befinden sich in verschiedenen β -Faltblättern, welche die Nukleotidbindetasche umgeben und sind in Richtung des Nukleotids ausgerichtet.

Der Vergleich der CDPKs mit den Konsensussequenzen, die sich aus den bereits erfolgreich mutierten Kinasen ergeben, zeigt Unterschiede. Dabei handelt es sich aber ausnahmslos um Aminosäuren, die eine β -Faltblattstruktur stärken könnten und somit einen positiven Einfluss auf die Struktur der ATP-Bindetasche haben sollten. Zum Beispiel Valin an Position 193 in NtCDPK2, könnte einen solchen positiven Effekt auf die β -Faltblattstruktur haben und ist dennoch klein genug, um die Bindung eines sperrigeren Nukleotids nicht zu stören. Isoleucin an Position 148 könnte aufgrund seiner Größe einen negativen Einfluss auf die Nukleotidbindung haben. Aufgrund seiner positiven Eigenschaften für die strukturelle Integrität der ATP-Bindetasche wurde diese Aminosäure aber ebenfalls nicht verändert. Threonin an Position 131 entspricht von der Größe der des Valins, das sich in der Mehrheit aller Kinasen an dieser Stelle befindet und könnte zudem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kinaseaktivität spielen (s. Kapitel 3.3.2).

3.2.2 Biochemische Charakterisierung der ATP-Bindetaschenvarianten

Für eine Substratmarkierung *in vitro* sollten die ATP-Bindetaschenvarianten drei Kriterien erfüllen: 1. Die ATP-Bindetaschenvarianten sollten N^6 -Benzyl-ATP als Phosphatdonor nutzen können. 2. Sie sollten eine höhere Bindungsaffinität für das ATP-Analogon aufweisen als für ATP, um unter zellulären Bedingungen $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-}N^6$ -Benzyl-ATP als bevorzugtes Substrat zu nutzen. 3. Sie sollten die gleiche Substratspezifität aufweisen wie das Wildtypenzym. Für eine Komplementation von T-DNA Insertionslinien sollten die ATP-Bindetaschenvarianten idealerweise die gleichen kinetischen Eigenschaften mit ATP als Phosphatdonor besitzen und sich andererseits aber bei signifikant niedrigeren Konzentrationen als das Wildtypenzym durch 1-NA-PP1 hemmen lassen.

3.2.2.1 Rekombinante NtCDPK2-His aus *E. coli* als Modell-CDPK

Zur biochemischen Charakterisierung wurde NtCDPK2-His durch zielgerichtete Mutagenese an Methionin 195 zu Alanin oder Glycin modifiziert. Beide Mutationen schafften einen zusätzlichen Raum in der ATP-Bindetasche, durch den N⁶-modifizierte Nukleotide und 1-NA-PP1 gebunden werden können. Es wurden beide Mutationen untersucht, da die Mutation zu Glycin häufig zu einer Inaktivierung der Kinase führt. NtCDPK2-His sowie die modifizierten Formen wurden in *E. coli* exprimiert und mittels Metallaffinitäts-Chromatographie aufgereinigt.

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Kinaseaktivität mit ATP als Phosphatdonor geändert hatte. Dazu wurde ein Kinasetest mit Syntide2 als Substratpeptid und [γ -³²P]-ATP als Phosphatdonor durchgeführt (Abbildung 3-8).

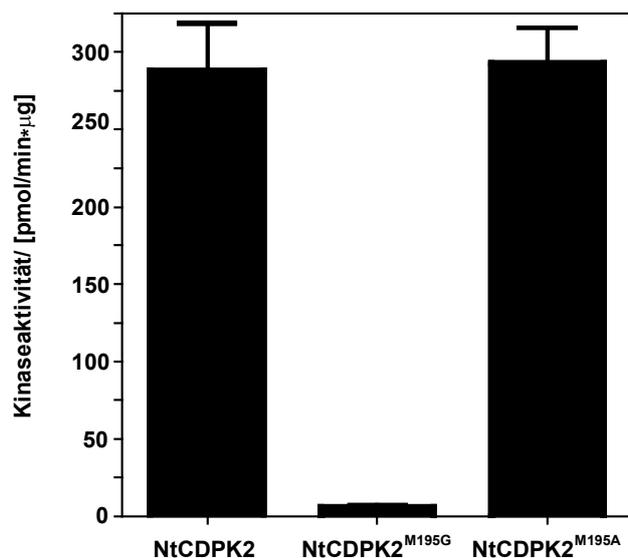


Abbildung 3-8 *In vitro* Kinasetest von NtCDPK2-His Wildtypenzym und ATP-Bindetaschenvarianten. NtCDPK2-His Wildtypenzym und ATP-Bindetaschenvarianten wurden nach Expression in *E. coli* und Aufreinigung mittels Metallaffinitäts-Chromatographie in einem Kinasetest mit dem Substratpeptid Syntide2 und [γ -³²P]-ATP als Phosphatdonor in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ für 10 Minuten inkubiert. Das phosphorylierte Substrat wurde an P-81 Anionenaustauscher-Papier gebunden und der Einbau von ³²P in das Peptid durch Szintillationsmessung bestimmt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler von Dreifachbestimmungen an.

Nach Austausch der „Gatekeeper“-Aminosäure (Met195) zu Alanin, zeigte NtCDPK2 immer noch eine dem Wildtypenzym vergleichbare Kinaseaktivität. Die Mutation zu Glycin hingegen führte zu einer Inaktivierung der Kinase. Dies korreliert mit Veröffentlichungen, in denen die Mutation zu Glycin zu einer Aktivitätsabnahme bis hin zur Inaktivität führte (Bishop *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2003). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass NtCDPK2^{M195A}-His einen höheren K_M-Wert für ATP besitzt. Das veränderte Mobilitätsverhalten nach Autophosphorylierung an Thr65 wurde dabei als Maß für eine *in vitro* Autophosphorylierungsrate genutzt. NtCDPK2^{M195A}-His liegt erst bei 100 µM

ATP zum Großteil in der autophosphorylierten Form vor, NtCDPK2-His hingegen bereits bei 10 μ M (Daten nicht gezeigt). Da dennoch beide Enzyme eine vergleichbare katalytische Effizienz besitzen, wird der erhöhte K_M -Wert offensichtlich durch eine höhere molekulare Aktivität (V_{max}) ausgeglichen. Ein weiterer Unterschied liegt in der Stabilität beider Enzyme. NtCDPK2-His konnte über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden, ohne signifikante Verluste der Enzymaktivität. NtCDPK2^{M195A}-His hingegen war bei gleicher Lagerung nur wenige Tage aktiv.

Kinasen sind Bisubstrat-Enzyme, die neben der Nukleotidbindetasche noch eine weitere Tasche für die Bindung des zu phosphorylierenden Substrats besitzen. Eine Mutation der „Gatekeeper“-Aminosäure kann zu einer Veränderung der Struktur der ATP-Bindetasche führen. Dies könnte sich, neben einer Inaktivierung der Kinase, auch auf die Substratbindetasche auswirken. Um zu untersuchen, ob die Veränderung der ATP-Bindetasche von CDPKs sich auf die Substratspezifität auswirkt, wurde ein kompetitiver Kinasetest durchgeführt. NtCDPK2 scheint *in vitro* nur sehr geringe Selektivität in Bezug auf verschiedene synthetische Peptid- oder Proteinsubstrate, wie z. B. Syntide2, MBP, Histon oder Glykogen-Synthase zu besitzen. Um eine tendenzielle Substratspezifität untersuchen zu können, wurden 5 Peptidsubstrate in gleicher Konzentration in einem Ansatz angeboten, von denen dann das Substrat mit der höchsten Affinität bevorzugt phosphoryliert werden sollte. Die Peptide leiteten sich von unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen verschiedener Isoformen der Saccharose-6-Phosphat-Synthase ab (Glinski *et al.*, 2003). Saccharose-6-Phosphat-Synthase wurde bereits als mögliches Substrat für CDPKs beschrieben (Huang und Huber, 2001), und abgeleitete Peptide konnten bereits *in vitro* von NtCDPK2 phosphoryliert werden. Zur Auswertung wurde der Anteil an jeweils phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Peptiden bestimmt und die Phosphorylierungsrate für jedes Peptid berechnet. Die Messungen erfolgten dabei durch Multiple Reaction Monitoring (MRMs) mit Hilfe eines Triplequad Massenspektrometers (in Zusammenarbeit mit Wolfram Weckwerth, MPI für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm).

Der kompetitive Kinasetest in Abbildung 3-9 zeigt, dass sich die Substratspezifitäten von Wildtypform und NtCDPK2^{M195A}-His nur geringfügig unterscheiden. Peptid 5 stellt für beide Formen das bevorzugte Substrat dar. Die Phosphorylierung von Peptid 2 durch das Wildtypenzym konnte in weiteren Versuchen nicht reproduzierbar nachgewiesen werden.

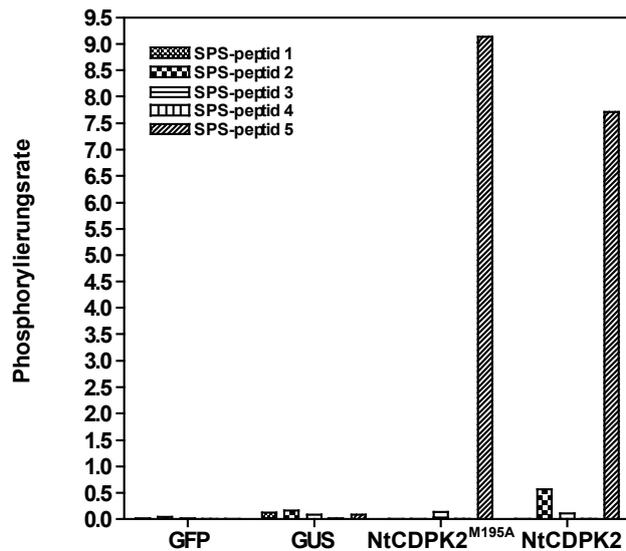


Abbildung 3-9 Kompetitiver Kinasetest mit NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195A}-His. NtCDPK2 Wildtypenzym und M195A-Mutante wurden in *E. coli* exprimiert, mittels Metallaffinitäts-Chromatographie aufgereinigt und in einem kompetitiven Kinasetest mit fünf Peptiden, abgeleitet von der Saccharose-6-Phosphat-Synthase (SPS), eingesetzt. GFP und GUS dienten als negative Kontrollen. Die Phosphorylierung der Peptide wurde in Zusammenarbeit mit Wolfram Weckwerth (MPIMP, Golm) massenspektrometrisch bestimmt.

Für Kinasetests von NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195A}-His mit N⁶-Benzyl-ATP als Phosphatdonor wurde N⁶-Benzyl-ADP chemoenzymatisch mit [γ -³²P] beladen (Böhmer, 2002). Dieses Verfahren erlaubte die Herstellung von [γ -³²P]-N⁶-Benzyl-ATP in kleinen Mengen aus jedem [γ -³²P]-markierten Nukleotid. Das radioaktiv markierte ATP-Analogon wurde in Kinasetests als Phosphatdonor eingesetzt.

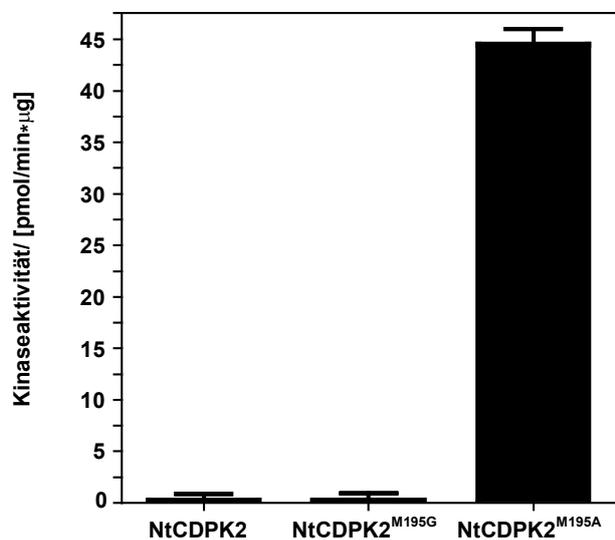


Abbildung 3-10 *In vitro* Kinasetest von NtCDPK2-His Wildtypenzym und ATP-Bindetaschenvarianten mit [γ -³²P]-N⁶-Benzyl-ATP als Phosphatdonor. Das Experiment wurde durchgeführt wie in Abbildung 3-8 beschrieben. Anstelle von [γ -³²P]-ATP wurde [γ -³²P]-N⁶-Benzyl-ATP im Test als Phosphatdonor verwendet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Doppelbestimmungen an.

Nur NtCDPK2^{M195A}-His konnte N⁶-Benzyl-ATP als Phosphatdonor nutzen, während NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195G}-His keine Kinaseaktivität zeigten. NtCDPK2^{M195G}-His wurde deshalb von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Im Vergleich zur Kinaseaktivität mit ATP als Phosphatdonor war die Kinaseaktivität von NtCDPK2^{M195A}-His jedoch um 80 % reduziert (vergleiche Abbildung 3-8). Ob dieser Unterschied auf einen erhöhten K_M -Wert für das Analogon oder auf eine verringerte katalytische Aktivität

zurückzuführen war, wurde durch die Bestimmung der Bindungskonstanten von N⁶-Benzyl-ATP für die Wildtypform und die ATP-Bindetaschenvariante untersucht.

Es konnte in einer Dünnschichtchromatographie gezeigt werden, dass bei der chemoenzymatischen Synthese neben $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-N}^6\text{-Benzyl-ATP}$ auch freies ^{32}P entsteht. Dies könnte bei der Bestimmung der eingesetzten spezifischen Radioaktivität zu falschen Ergebnissen führen und eine direkte Bestimmung der Bindungskonstanten erschweren. Daher wurde anstelle einer direkten Bestimmung des K_M -Wertes für N⁶-Benzyl-ATP ein Kinasetest mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durchgeführt, zu dem steigende Konzentrationen von nicht-radioaktivem N⁶-Benzyl-ATP zugegeben wurden. Die Zugabe eines Überschusses an nicht-radioaktivem Substrat verringerte den Anteil an ^{32}P , das in das Substratpeptid Syntide2 eingebaut wurde, was in den Hemmkurven zum Ausdruck kommt. Um den Einfluss der unterschiedlichen K_M -Werte für ATP zwischen NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195A}-His auszuschließen, wurde eine femtomolare Konzentration von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ im Versuch verwendet. Dadurch konnte aus den Inhibitionskurven auch direkt die K_i -Werte für beide Enzyme bestimmt werden (s. 5.2.3.11). Der berechnete K_i -Wert diente der Abschätzung des K_M -Wertes für N⁶-Benzyl-ATP.

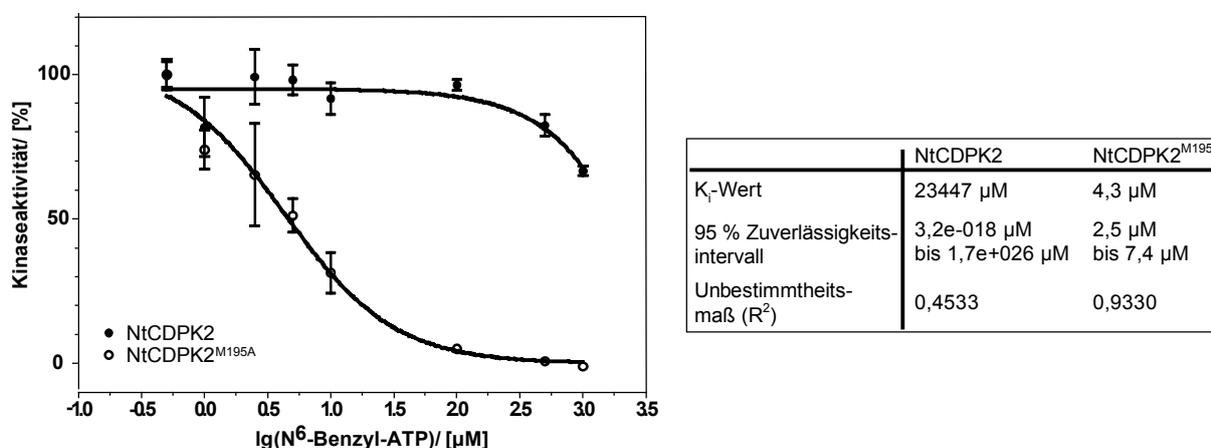


Abbildung 3-11 Bestimmung der Hemmkinetiken von N⁶-Benzyl-ATP für NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195A}-His. Der Kinasetest wurde wie in Abbildung 3-8 beschrieben durchgeführt. Durch Zugabe steigender Konzentrationen des nicht-radioaktiven Alternativsubstrates N⁶-Benzyl-ATP nahm der Einbau von ^{32}P in das Substratpeptid Syntide2 ab, was in einem Rückgang der gemessenen Radioaktivität resultierte. Die Bestimmung des K_i -Wertes und die statistische Auswertung erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism.

Für NtCDPK2^{M195A}-His konnte ein K_i -Wert für N⁶-Benzyl-ATP von 4,3 μM bestimmt werden. Dieser Wert liegt niedriger als die ATP-Konzentration, die für eine quantitative Autophosphorylierung nötig war. Er befindet sich auch im unteren Bereich bislang mutierter

Kinasen, für die K_i -Werte für N^6 -Benzyl-ATP zwischen 2,5 μM und 17 μM bestimmt wurden (Shah *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Gillespie *et al.*, 1999; Kraybill *et al.*, 2002). Der K_i -Wert für das Wildtypenzym konnte nur ungenau bestimmt werden, da Konzentrationen über 1 mM experimentell nicht appliziert werden konnten.

Der Vergleich der errechneten K_i -Werte aus den Inhibitionskurven für NtCDPK2^{M195A}-His und NtCDPK2-His zeigte, dass N^6 -Benzyl-ATP 5000fach selektiver für die ATP-Bindetaschenvariante ist. Dies bedeutet, dass nicht der K_M -Wert Ursache für die verringerte Aktivität mit N^6 -Benzyl-ATP ist, sondern dies auf einen verringerten V_{max} -Wert zurückzuführen sein muss. Der niedrige K_M -Wert lässt außerdem vermuten, dass auch bei Anwesenheit hoher ATP-Konzentrationen, NtCDPK2^{M195A}-His bevorzugt N^6 -Benzyl-ATP binden würde.

1-NA-PP1 ist ein modifizierter Tyrosinkinase-Inhibitor (Hanke *et al.*, 1996), der daraufhin verändert wurde, dass nur noch ATP-Bindetaschenvarianten von Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen inhibiert werden (Bishop *et al.*, 2001). Anders als bei N^6 -Benzyl-ATP handelte es sich hierbei nicht um ein alternatives Substrat, sondern um einen zellgängigen Inhibitor, der in den *in vivo* Inhibierungstests in *A. thaliana* eingesetzt werden sollte. Um zunächst den K_i -Wert des Inhibitors für NtCDPK2 zu bestimmen, wurde ein Kinasetest mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und Syntide2 durch steigende Konzentrationen von 1-NA-PP1 inhibiert.

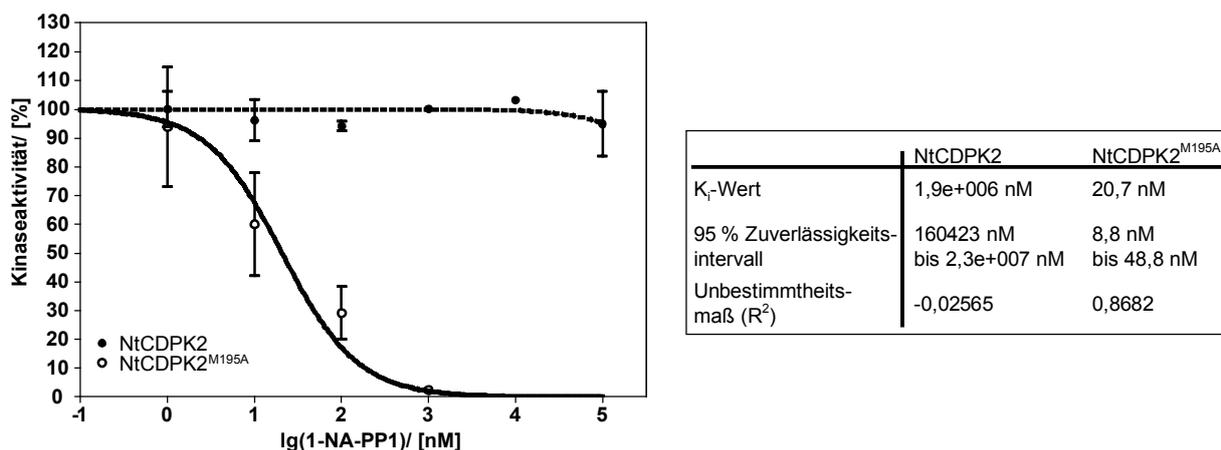


Abbildung 3-12 Bestimmung der Hemmkinetiken von 1-NA-PP1 für NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195A}-His. Der Kinasetest wurde wie in Abbildung 3-8 beschrieben durchgeführt. Die Kinasereaktion wurde durch steigende Konzentrationen von 1-NA-PP1 inhibiert. Die Bestimmung des K_i -Wertes und die statistische Auswertung erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism.

Für NtCDPK2^{M195A}-His konnte ein K_i -Wert für 1-NA-PP1 von 20,7 nM bestimmt werden. Dies liegt im unteren Bereich der Werte, die bislang für modifizierte Ser/Thr-Kinasen gemessen wurden (Bishop *et al.*, 2000). Der K_i -Wert des Wildtypenzym war nur ungenau zu bestimmen, da experimentell nicht mehr als 100 μ M 1-NA-PP1 zugegeben werden konnten. Im 95 % Zuverlässigkeitsintervall liegen Werte zwischen 160 μ M und 23 mM, mit dem am besten passenden Wert von 1,9 mM. Damit liegen diese Werte deutlich über den K_i -Werten anderer Ser/Thr-Wildtypkinasen, die K_i -Werte von 20 μ M aufweisen (Bishop *et al.*, 2000). Das Verhältnis der berechneten K_i -Werte von NtCDPK2-His und NtCDPK2^{M195A}-His übersteigt auch bei vorsichtigen Schätzungen 5 Zehnerpotenzen. Dies bedeutet, dass 1-NA-PP1 sowohl wegen des niedrigen K_i -Wertes, als auch aufgrund des großen Unterschieds zur Wildtypform einen geeigneten Inhibitor für reverse *in vivo* Experimente darstellen könnte.

Mit NtCDPK2^{M195A} als Modellenzym konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die „Gatekeeper“-Mutation auch in CDPKs die Inhibition durch 1-NA-PP1 und die Nutzung von N⁶-Benzyl-ATP als Phosphatdonor ermöglicht.

3.2.2.2 Generierung und Analyse von AtCPK1- und AtCPK2-ATP-Bindetaschenvarianten

Für den reversen chemisch-genetischen Ansatz wurden ATP-Bindetaschenvarianten von AtCPK1 und AtCPK2 erzeugt und charakterisiert. Anders als NtCDPK2, die für die biochemische Charakterisierung in *E. coli* exprimiert worden war, wurden AtCPK1 und AtCPK2 rekombinant in dem heterologen Pflanzensystem *N. benthamiana* exprimiert. Die Expression in Pflanze ermöglicht dabei die Berücksichtigung posttranslationaler Modifikationen. Die „Gatekeeper“-Aminosäuren wurden in den AtCPKs analog zu NtCDPK2 durch einen primären Proteinsequenzvergleich identifiziert (Abbildung 3-7) und entsprechend zu Alanin mutagenisiert. Die cDNAs von AtCPK1 und AtCPK2 mit „Gatekeeper“-Mutation wurden in den binären Expressionsvektor pXCSG-StrepII kloniert (Witte *et al.*, 2004), wobei C-terminal ein StrepII-Epitop-tag eingeführt wurde. Die Konstrukte wurden in *N. benthamiana* transient exprimiert und die Kinasen anschließend aufgereinigt. Durch den Vergleich verschiedener Aufreinigungsverfahren wurde ein Protokoll entwickelt, das es erlaubte, innerhalb kurzer Zeit Protein im Nanogrammbereich zu erhalten. Diese Menge war ausreichend, um verlässliche Kinasetests mit Syntide2 als Peptidsubstrat durchführen zu können und ebenso für die Suche nach Phosphorylierungsstellen (s. Abbildung 3-23). Die Bestimmung der Hemmkinetiken von 1-NA-PP1 wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

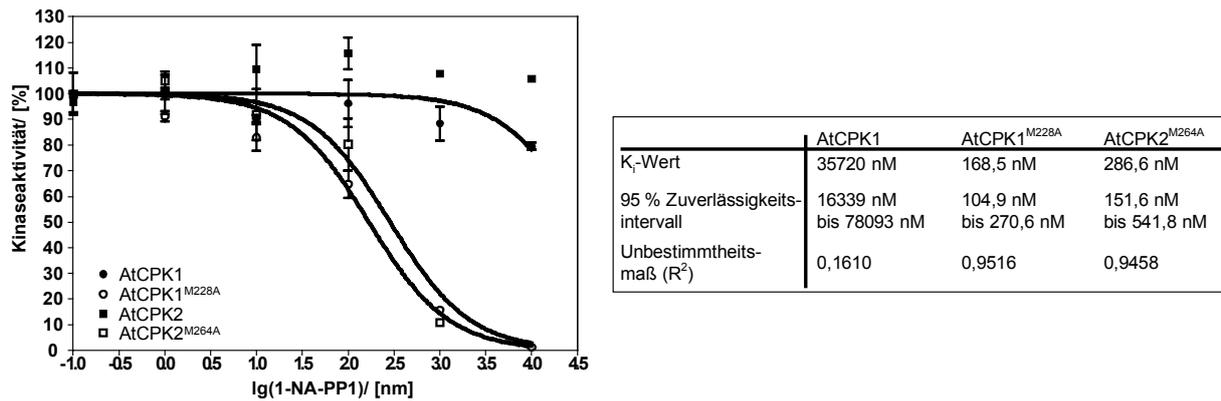


Abbildung 3-13 Bestimmung der Hemmkinetiken von 1-NA-PP1 für AtCPK1-StrepII, AtCPK1^{M228A}-StrepII, AtCPK2-StrepII und AtCPK2^{M264A}-StrepII. Wildtypformen und ATP-Bindetaschenvarianten von AtCPK1 und AtCPK2 wurden nach transienter Expression in *N. benthamiana* und StrepII-Aufreinigung in einem Kinasetest mit dem Substratpeptid Syntide2 und [γ -³²P]-ATP als Phosphatdonor in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ für 10 Minuten inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch steigende Konzentrationen von 1-NA-PP1 inhibiert. Phosphoryliertes Substrat wurde an P-81 Anionenaustauscher-Papier gebunden und der Einbau von ³²P in Syntide2 durch Szintillationsmessung bestimmt. Die Berechnung des IC₅₀-Wertes und die statistische Auswertung erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Doppelbestimmungen an.

Für AtCPK2^{M264A}-StrepII konnte für 1-NA-PP1 ein K_i-Wert von 286,6 nM bestimmt werden. Dies ist eine Zehnerpotenz höher als für NtCDPK2^{M195A}-His. Allerdings ist auch hier eine deutliche Differenz zur Wildtypform vorhanden, da AtCPK2-StrepII bei einer Inhibitor-konzentration von 100 μ M noch keine Verringerung der Kinaseaktivität zeigt. Ein K_i-Wert konnte demnach nicht bestimmt werden. Der K_i-Wert für AtCPK1^{M228A}-StrepII liegt bei 168,5 nM. Dieser Wert liegt nur etwa zwei Zehnerpotenzen unter dem der entsprechenden Wildtypform. Trotz der hohen Homologie der ATP-Bindetaschen der drei CDPK-Isoformen scheint es daher deutliche Unterschiede in der Struktur zu geben. Da die nachfolgenden Versuche aber immer im direkten Vergleich mit Wildtyppflanzen durchgeführt wurden, erschien eine Differenz von zwei Zehnerpotenzen im Falle von AtCPK1 als ausreichend für die geplanten *in vivo* Experimente.

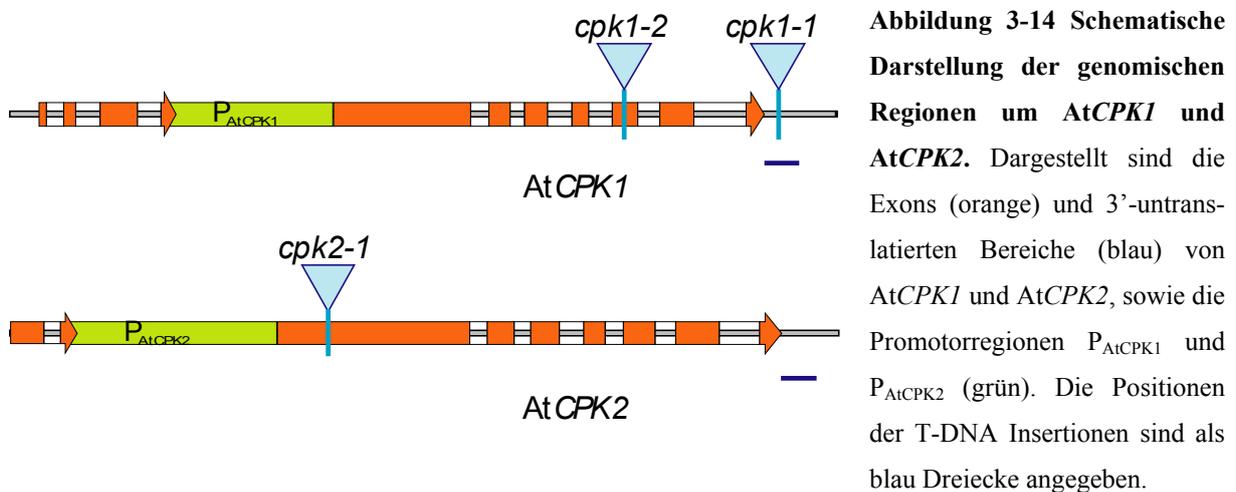
3.2.3 Herstellung von chemisch-inhibierbaren Mutantenlinien in *A. thaliana*

Nachdem die biochemische Charakterisierung gezeigt hat, dass alle Voraussetzungen erfüllt sind, die chemisch-genetische Methode auf CDPKs anzuwenden, wurden für die geplanten reversen chemisch-genetischen Experimente inhibierbare Mutanten von AtCPK1 und

AtCPK2 in *Arabidopsis* generiert. Als Mutanten-Linien für einzelne CDPKs wurden zunächst T-DNA-Insertionslinien der beiden Isoformen isoliert und charakterisiert, um diese dann mit den entsprechenden ATP-Bindetaschenvarianten zu transformieren.

3.2.3.1 T-DNA Insertionslinien von AtCPK1 und AtCPK2

Für AtCPK1 standen zwei T-DNA Insertionslinien mit unabhängigen Allelen zur Verfügung: *cpk1-1* (GABI; Rosso *et al.*, 2003) und *cpk1-2* (SALK; Alonso *et al.*, 2003). Für AtCPK2 existierte nur eine T-DNA Insertionslinie: *cpk2-1* (SALK). Die genauen Positionen der T-DNA Insertionen wurden durch PCR mit einem genspezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer und anschließender Sequenzierung bestimmt (Abbildung 3-14).



Die T-DNA Insertion in *cpk1-2* konnte im fünften Exon von AtCPK1 lokalisiert werden, in *cpk1-1* liegt die Insertion im 3'-untranslatierten Bereich. In *cpk2-1* liegt die Insertion im ersten Exon von AtCPK2. Die Sequenzierungen zeigen dass es in keinem der drei Fälle zu Rekombinationsereignissen im Bereich der T-DNA Insertion gekommen ist.

Mittels RT-PCR sollte überprüft werden, ob die T-DNA Insertionen die Expression der entsprechenden Gene tatsächlich reprimieren.

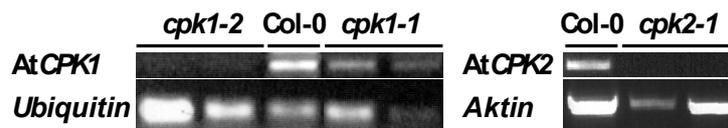


Abbildung 3-15 RT-PCR-Analyse zur Expression von AtCPK1 und AtCPK2 in den T-DNA Insertionslinien im Vergleich zu Col-0 Pflanzen. Mittels PCR wurde AtCPK1 cDNA in 35 Zyklen aus *cpk1-1* und *cpk1-2* und Col-0 amplifiziert. AtCPK2 cDNA wurde in 40 Zyklen aus *cpk2-1* und Col-0 amplifiziert.

Ubiquitin und *Aktin* dienten jeweils als Ladekontrolle und wurden in 25 Zyklen aus den jeweiligen Linien amplifiziert. Es wurden für jede Mutante jeweils 2 Pflanzen untersucht.

In einer RT-PCR-Analyse mit RNA aus Rosettenblättern junger Pflanzen konnte in den Linien mit Insertion im Exon, *cpk1-2* bzw. *cpk2-1*, keine mRNA des entsprechenden Gens nachgewiesen werden (Abbildung 3-15). In der Linie *cpk1-1* war die Transkriptmenge im Vergleich zu Col-0 deutlich reduziert, vermutlich durch eine Destabilisierung des Transkripts durch die T-DNA Insertion. Diese Linie wurde jedoch nicht weiter verwendet. Die Linien *cpk1-2* und *cpk2-1* wurden im weiteren Verlauf mit dem Gen des entsprechenden Wildtypenzym sowie der ATP-Bindetaschenvariante komplementiert. Die Konstrukte enthielten das Gen inklusive aller Introns und den bereits für die GUS-Konstrukte verwendeten nativen Promotoren. Zusätzlich trugen die zur Komplementation verwendeten AtCPK1- und AtCPK2-Varianten C-terminal ein Hämagglutinin (HA) und StrepII-Epitop-tag. Mindestens zwei unabhängige homozygote Linien pro Konstrukt wurden selektioniert und charakterisiert.

3.2.3.2 Phänotypische Charakterisierung von *cpk1-2* und *cpk2-1*

Bisher waren für einzelne *A. thaliana* Linien, die für eine CDPK defizient waren, keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten berichtet worden. Mit dem nun vorhandenen zusätzlichen Wissen über die spezifische Lokalisation wurden einige gezielte morphologische Untersuchungen durchgeführt.

Die spezifische Lokalisation von AtCPK2 in Trichomen, Wurzelhaaren und Pollen legte eine Analyse in Bezug auf diese Gewebe nahe. Dazu wurde zunächst mittels Rasterelektronenmikroskopie die Oberflächenstruktur von Trichomen und Pollen der Linie *cpk2-1* im Vergleich zu Col-0 betrachtet. Präparate wurden nach Fixierung auf dem Präparatehalter mit Stickstoff gekühlt und nach Goldbedampfung unter Hochvakuum im Rasterelektronenmikroskop betrachtet (Abbildung 3-16).

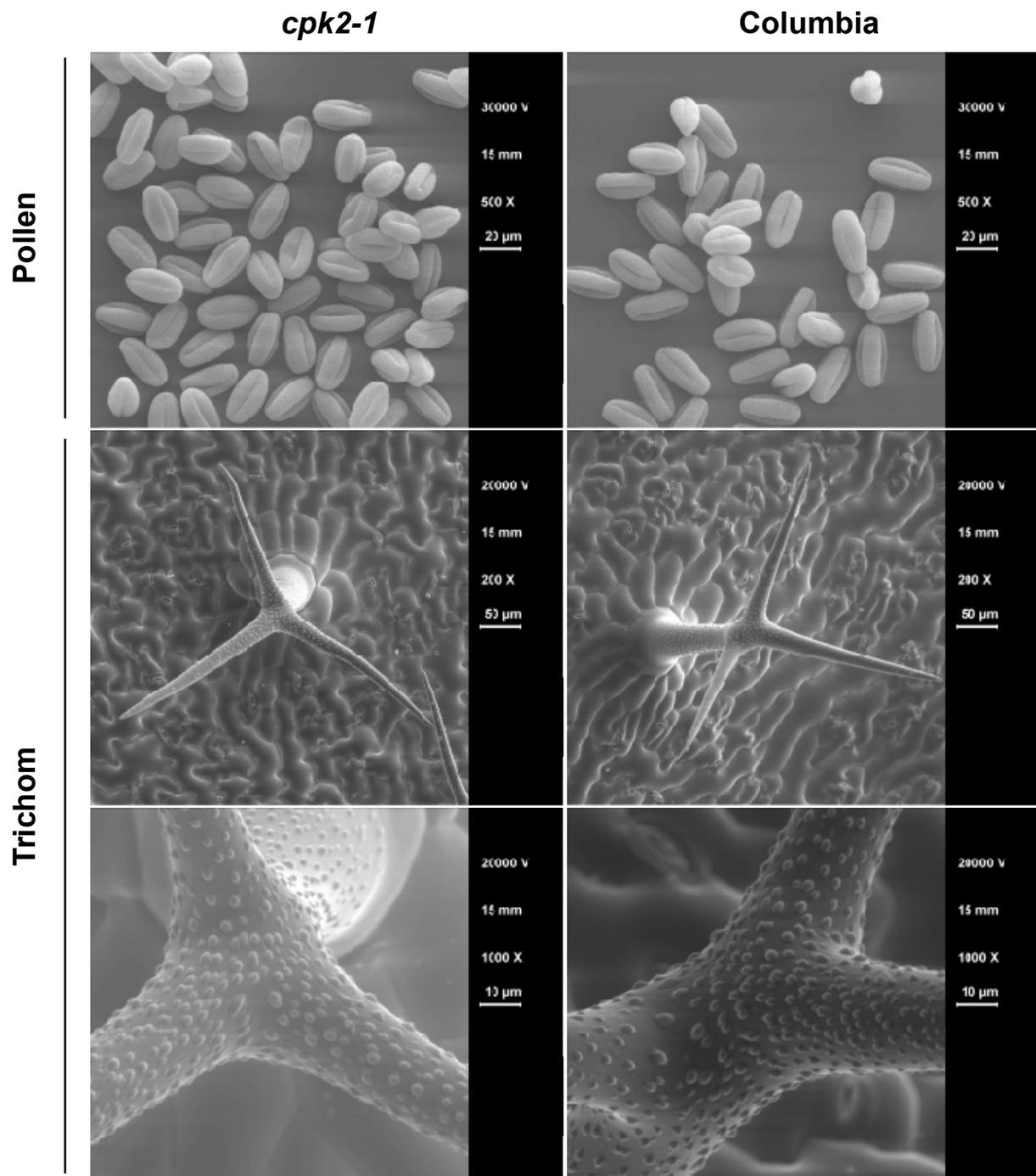


Abbildung 3-16 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollen und Trichomen von *cpk2-1* und Col-0 im Vergleich. Pollen und Trichome von sechs Wochen alten Pflanzen wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt, mit Gold bedampft und in einem Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskop analysiert. Aufnahmeparameter und Größenskalen sind neben den einzelnen Bildern angegeben.

In keiner der beiden Zellstrukturen konnten Unterschiede zwischen Col-0 und *cpk2-1* festgestellt werden. Auch der Prozentsatz der Trichome, die vier Verzweigungen, anstelle von drei aufwiesen, war unverändert.

Als nächstes wurde der Einfluss der *AtCPK2* Mutation in Bezug auf die Pollenkeimung untersucht. Zunächst wurde die Keimfähigkeit der Pollen von Wildtyppflanzen und *cpk2-1*-Pflanzen verglichen. Der Fluorescein Diacetat (FDA)-Test ist der am weitesten verbreitete Test zur Bestimmung der Pollenkeimfähigkeit (Heslop-Harrison und Heslop-Harrison, 1970). Keimfähige Pollenkörner mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff auf und setzen ihn durch zelluläre Esterasen zu Fluorescein um. Fluorescein kann die intakten Plasmamembranen nicht durchdringen und akkumuliert in der Zelle. Dies kann unter dem UV-Mikroskop nach Anregung als starke Fluoreszenzemission beobachtet werden. Nichtkeimfähige Pollenkörner besitzen oft keine intakte Plasmamembran. Fluorescein kann aus der Zelle diffundieren, was sich anhand einer deutlich schwächeren Fluoreszenz zeigen lässt.

Pollen von sechs Wochen alten *cpk2-1* und Col-0 Pflanzen wurden auf *in vitro* Keimungsmedium (Stadler *et al.*, 1999) gebettet und mit Fluorescein Diacetat (FDA)-Färbelösung überschichtet. Sowohl für *cpk2-1*-Pollen, wie auch für Wildtyppollen wurde eine Keimfähigkeit von über 90% beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Keimung des Pollens und das Wachstum des Pollenschlauchs sind maßgeblich von der Kalziumkonzentration im Keimungsmedium abhängig. Hätte *AtCPK2* einen Einfluss auf die Ausbildung des Pollenschlauchs, wäre eine Rolle in dieser Kalzium-Signaltransduktion nahe liegend. Daher wurden Pollenkörner von *cpk2-1* und Col-0 Pflanzen für vier Stunden auf *in vitro* Keimungsmedium (Stadler *et al.*, 1999), das verschiedenen Konzentrationen an Kalzium enthielt, ausgelegt. Anschließend wurden die Pollenkörner unter dem Mikroskop analysiert. Dabei wurden ausschließlich Pollenkörner berücksichtigt, die auf dem Keimungsmedium weit voneinander getrennt lagen, da auch die Pollenkörner Kalzium ins Medium abgeben und die Konzentration dadurch lokal verändern könnten. Die Keimungsrate wurde durch den Vergleich gekeimter und nicht-gekeimter Pollenkörner ermittelt. Für die Bestimmung des Pollenschlauchwachstums wurden gekeimte Pollenkörner fotografiert und die Länge des Pollenschlauchs mit einer Bildbearbeitungssoftware (Diskus, TBK Hilgers, Königswinter) bestimmt.

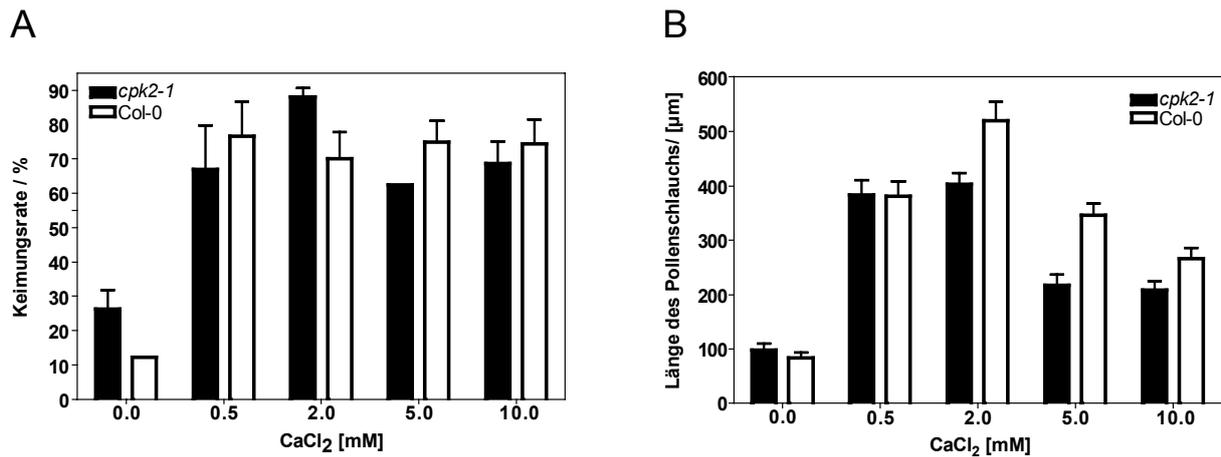


Abbildung 3-17 Vergleich der Pollenkeimungsrate und der Pollenschlauchlänge von *cpk2-1* und *Col-0* bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen. Pollenkörner von 6 Wochen alten Pflanzen der Linien *cpk2-1* und *Col-0* wurden 4 Stunden auf *in vitro* Keimungsmedium (Stadler *et al.*, 1999) ausgekeimt. Die Keimungsrate wurde durch Auszählen gekeimter Pollenkörner ermittelt, die Pollenschlauchlänge wurde nach Fotografieren der Pollenschläuche mit der Diskus Software (TBK Hilgers, Königswinter) bestimmt.

Die Keimungsrate war in der *cpk2-1* Mutante unverändert gegenüber Wildtyppollen (Abbildung 3-17 A). Die Analyse des Pollenschlauchwachstums bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen ergab jedoch ein reproduzierbar geringeres Wachstum bei höheren Kalziumkonzentrationen von 2-5 mM in der *cpk2-1* Mutante im Vergleich zu *Col-0* (Abbildung 3-17 B).

3.2.4 Etablierung einer chemisch-genetischen Analyse

Um die AtCPK1- und AtCPK2-ATP-Bindetaschenmutanten einer chemisch-genetischen Analyse unterziehen zu können, musste ein Protokoll entwickelt werden, mit dem es möglich sein würde, den Inhibitor und eine Reihe verschiedener Stresstimuli *in planta* zu applizieren. Drei Bedingungen sollte ein solches Protokoll erfüllen: 1. Die Aufzuchtbedingungen sollten die natürliche Entwicklung der Pflanzen nicht stören. 2. Der Inhibitor sollte gleichmäßig und einfach in genau definierten Mengen appliziert werden können. 3. Eine große Anzahl von Pflanzen sollte gleichzeitig analysiert werden können, um die biologische Varianz zu minimieren.

Zudem musste eine Inhibitorkonzentration gefunden werden, bei der ausschließlich die ATP-Bindetaschenvarianten inhibiert werden. Letzteres war neben den unterschiedlichen K_i -Werten maßgeblich davon abhängig, wie gut der Inhibitor in die Zellen eindringen kann.

Das Wachstum von Pflanzen in Erde wäre für die Entwicklung der Pflanzen optimal, hätte aber das Problem, dass der Inhibitor nicht gleichmäßig und in definierten Mengen appliziert

werden könnte. Durch Sprühen oder durch Gießen wäre dies kaum zu erreichen gewesen. Es wurde deshalb ein Protokoll basierend auf hydroponischen Schüttelkulturen entwickelt. Dieses hatte den Vorteil, dass 30-40 Pflanzen pro Ansatz in einem Erlenmeyerkolben unter gleichen Bedingungen aufgezogen werden konnten. Darüber hinaus konnten genau definierte Mengen des Inhibitors durch Verdünnen im Wachstumsmedium appliziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Pflanzen in den Kolben nicht negativ beeinflusst wird. Oft bilden Pflanzen in Flüssigkulturen bereits nach kurzer Zeit Chlorosen oder andere Anzeichen mangelhafter Wachstumsbedingungen aus. Dies konnte durch eine Verringerung der Lichtzufuhr und durch den Zusatz von 1% Saccharose ins Medium unterbunden werden. Die Pflanzen wurden bereits nach 12 Tagen Wachstum unter diesen Bedingungen analysiert. Erst bei verlängertem Wachstum von bis zu 4-5 Wochen wiesen einzelne Pflanzen Anzeichen von Chlorosen auf (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.1 Versuchsplanung

Für AtCPK1 wurden nach der Komplementation der T-DNA Insertionslinie *cpk1-2* mit der ATP-Bindetaschenvariante drei homozygote Linien selektioniert und charakterisiert. Die drei Linien wiesen mit Col-0 vergleichbare Expressionsstärken für AtCPK1 auf, so dass zunächst die Linie MB2.4.6.1 für die reverse chemisch-genetische Analyse ausgewählt wurde. Jeweils 30-40 Col-0 und MB2.4.6.1 Pflanzen pro Kolben wurden 12 Tage in hydroponischen Schüttelkulturen bei konstanten Lichtbedingungen in der Phytokammer inkubiert. Anschließend wurde ein Kolben pro Linie mit 100 μM 1-NA-PP1 inkubiert. Obwohl die K_i -Werte von 1-NA-PP1 in *in vitro* Studien mit isoliertem Protein für die ATP-Bindetaschenvarianten im nanomolaren Bereich liegen, wurde vermutet, dass aufgrund von Diffusionsbarrieren vor allem durch die pflanzliche Zellwand, eine wesentlich höhere Konzentration appliziert werden musste. In Experimenten mit Zellkulturen oder Hefe sind bislang Konzentrationen von 2-20 μM 1-NA-PP1 erfolgreich verwendet worden (Weiss *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2002; Niswender *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2002).

Als Stresstimulus für die chemisch-genetische Analyse wurde zunächst eine Temperaturverringerung von 21 °C auf 4 °C ausgewählt, da AtCPK1, wie man den Microarraydaten entnehmen konnte, einen starken Anstieg der Expressionsstärke nach Kältestress zeigte. Zudem konnten die experimentellen Bedingungen für ein solches Experiment geschaffen werden.

In einem ersten Testversuch wurden ein Inhibitor-behandelter und ein nicht-behandelter Kolben pro Linie eine Stunde bei 4 °C im Eis/Wasserbad abgekühlt. Ein Kolben pro Linie

verblieb als Kontrolle bei 21 °C. Anschließend wurden die Pflanzen auf Miracloth-Filter mit 50 % Ethanol und H₂O_{bidest} gewaschen, um das Medium abzuspielen, welches anschließende Analysen stören könnte. Nach dem Trocknen der Pflanzen mit Filterpapier wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das Blattmaterial wurde anschließend homogenisiert und für die Analyse von Transkriptom und Proteom verwendet. Durch den Vergleich der gestressten Proben mit und ohne Inhibitorbehandlung konnten Unterschiede identifiziert werden, die auf eine AtCPK1-Abhängigkeit hinweisen. Durch den Vergleich von Inhibitor-behandelten Proben von Col-0 und MB2.4.6.1 konnten die Unterschiede identifiziert werden, die auf einen AtCPK1-unabhängigen Effekt von 1-NA-PP1 hindeuten. Der Vergleich der Proben von Col-0 und MB2.4.6.1 ohne Inhibitorbehandlung zeigte die Unterschiede auf, die auf eine unvollständige Komplementation der AtCPK1-aktivität durch die ATP-Bindetaschenvariante hindeuten.

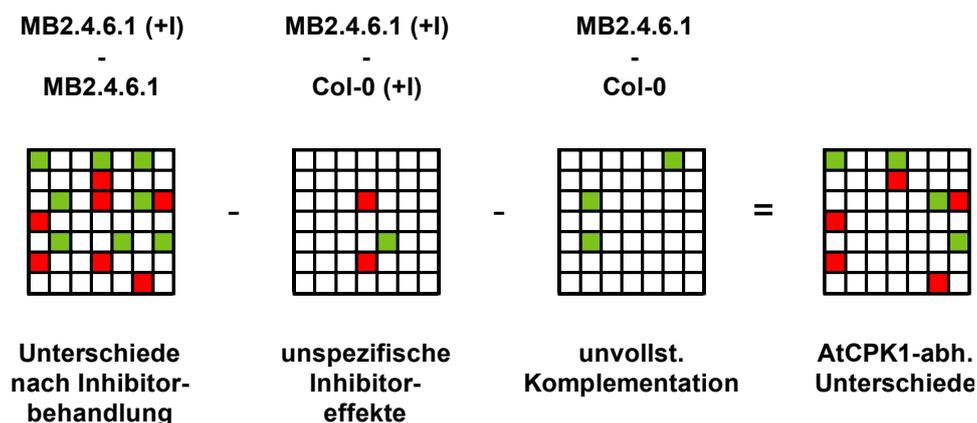


Abbildung 3-18 Übersicht über die Versuchsauswertung. Von den Unterschieden in der MB2.4.6.1 Linie nach Inhibitorbehandlung die sich aus den Analysen von Transkriptom und Proteom ergeben, dargestellt durch grüne und rote Kästchen, werden die Unterschiede abgezogen, die sich aus unspezifischen Inhibitor-effekten oder einer unvollständigen Komplementation durch die ATP-Bindetaschenvarianten ergeben. Verändert nach Shokat *et al.* (2002)

3.2.4.2 Bestimmung der Inhibitorkonzentration

Da CDPK-Mutanten keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten zeigten, konnte dies nicht zur Optimierung der Inhibitorkonzentration herangezogen werden. Deshalb wurde eine molekulare Antwort gewählt. Nach Kältestress, wird der Kältemarker CBF3 transkriptionell hochreguliert (s. unten). Durch höhere 1-NA-PP1-Konzentrationen wurde diese Antwort in der Col-0 Linie unterbunden. Das Auftreten dieses Effekts in der Wildtyplinie zeigte, dass es sich hierbei um eine unspezifische Inhibition von Signalwegen in

der Zelle handeln musste. Parallel zur Transkriptom- und Proteomanalyse wurde daher bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen (10 μM und 100 μM) die Transkriptakkumulation von CBF3 mittels Real-Time-PCR bestimmt.

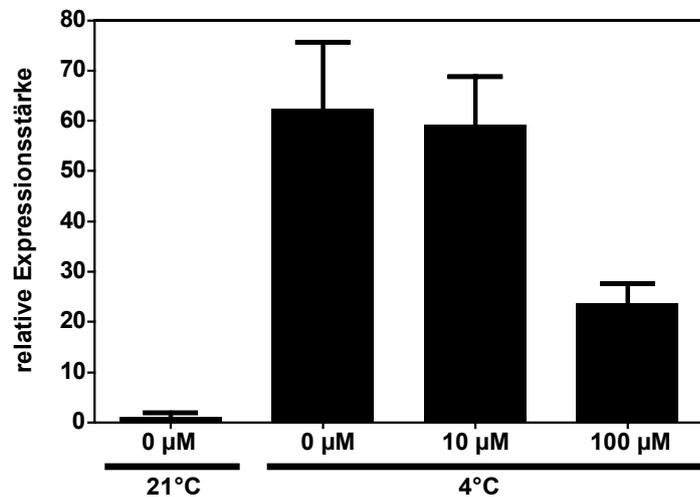


Abbildung 3-19 Transkriptionelle Hochregulation des Kältemarkers CBF3 nach Kältestress bei verschiedenen 1-NA-PP1 Konzentrationen. 12 Tage alte Col-0 Pflanzen aus hydroponischen Schüttelkulturen wurden für eine halbe Stunde mit verschiedenen Konzentrationen 1-NA-PP1 behandelt, bevor sie für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert wurden. Die Transkriptmenge von CBF3 wurde durch Real-Time-PCR bestimmt.

Die Inhibitorkonzentration von 100 μM liegt deutlich über den bislang bestimmten K_i -Werten für Ser/Thr-Wildtypkinasen und es konnte eine Reduktion der Expression des Kältemarkers CBF3 um 60 % im Vergleich zu Kontroll-Pflanzen gemessen werden (Abbildung 3-19). Eine Inhibitorkonzentration von 10 μM hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss.

3.2.5 Chemisch-genetische Analyse von AtCPK1 nach Kältestress

3.2.5.1 Transkriptionelle Regulation von Markergenen

Kältestress führt in *Arabidopsis* zu deutlich messbaren Veränderungen im Transkriptom. Insgesamt 514 Gene werden differentiell reguliert (Vogel *et al.*, 2005). Eine umfassende Analyse dieser transkriptionellen Veränderungen wäre nur durch Microarrayanalysen möglich. In dieser Untersuchung wurden fünf Gene ausgewählt, die nach Kältestress, eine schnelle Veränderung ihrer Transkriptmenge zeigen. Die Transkriptanalyse dieser Gene mittels RT-PCR erlaubte eine schnelle Analyse der experimentellen Bedingungen, um beurteilen zu können, ob und wie stark die Pflanzen Kältestress ausgesetzt waren.

Ein Cluster von Genen, das durch die Transkriptionsfaktoren CBF1, CBF2 und CBF3 reguliert wird, nimmt eine wichtige Rolle in der Kältestressanpassung ein. Ein weiteres Cluster parallel zum CBF Cluster wird vom Transkriptionsfaktor ZAT12 reguliert. Alle Transkriptionsfaktoren zeigen bereits eine Stunde nach Temperaturveränderung eine sehr starke Erhöhung ihrer Expressionsraten, weshalb CBF2, CBF3 und ZAT12 in diese

Untersuchung mit einbezogen wurden. Neben den beiden Transkriptionsfaktoren wurden zwei weitere Gene untersucht, die ebenfalls hochreguliert werden, aber in keinem der beiden Cluster liegen: 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase 6 (ACS6) und das salztolerante Zinkfinger-Protein (STZ/ZAT10).

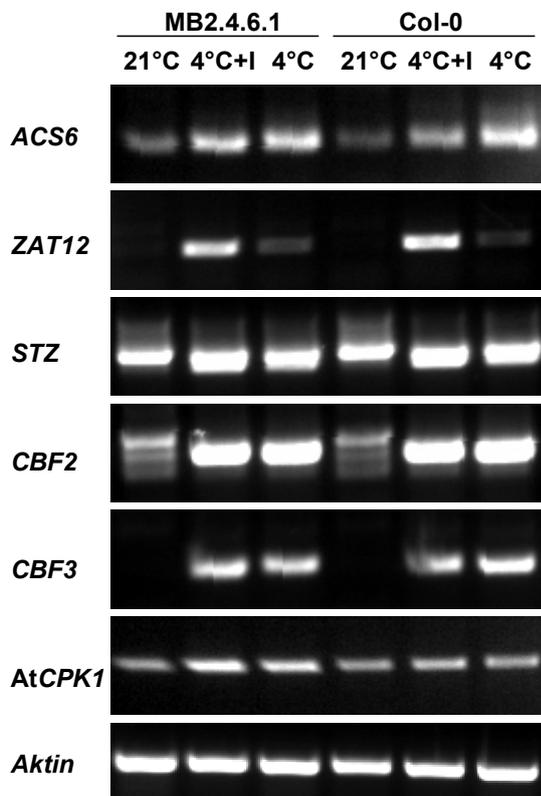


Abbildung 3-20 Expression von Markergenen nach Kältestress in Abhängigkeit vom Inhibitor 1-NA-PP1.

Jeweils 30-40 Pflanzen pro Kolben der Linien MB2.4.6.1 und Col-0 wurden 12 Tage als hydroponische Schüttelkulturen inkubiert. Jeweils 1 Kolben jeder Linie wurde für eine halbe Stunde mit 100 μ M 1-NA-PP1 inkubiert (+I). Nach der Inkubation eines behandelten und eines unbehandelten Kolbens jeder Linie in einem Eis/Wasserbad bei 4°C für eine Stunde wurden die Pflanzen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den Proben wurde Gesamt-RNA extrahiert und mittels RT-PCR die Transkriptmengen von Kältemarkern und AtCPK1 im Vergleich zur Aktin-Kontrolle bestimmt. Das AtCPK1-Transkript wurde in 35 Zyklen, die übrigen Transkripte in 25 Zyklen amplifiziert.

Die Transkriptanalyse (Abbildung 3-20) zeigte, dass es zu einer deutlichen Kältestressantwort in beiden Linien gekommen ist. Alle Kältemarker zeigen eine erhöhte Expression nach Kältestress. Besonders deutlich wird dies bei den Transkriptionsfaktoren CBF2, CBF3 und bei ZAT12. Auch bei AtCPK1 ist bereits nach einer Stunde eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge erkennbar.

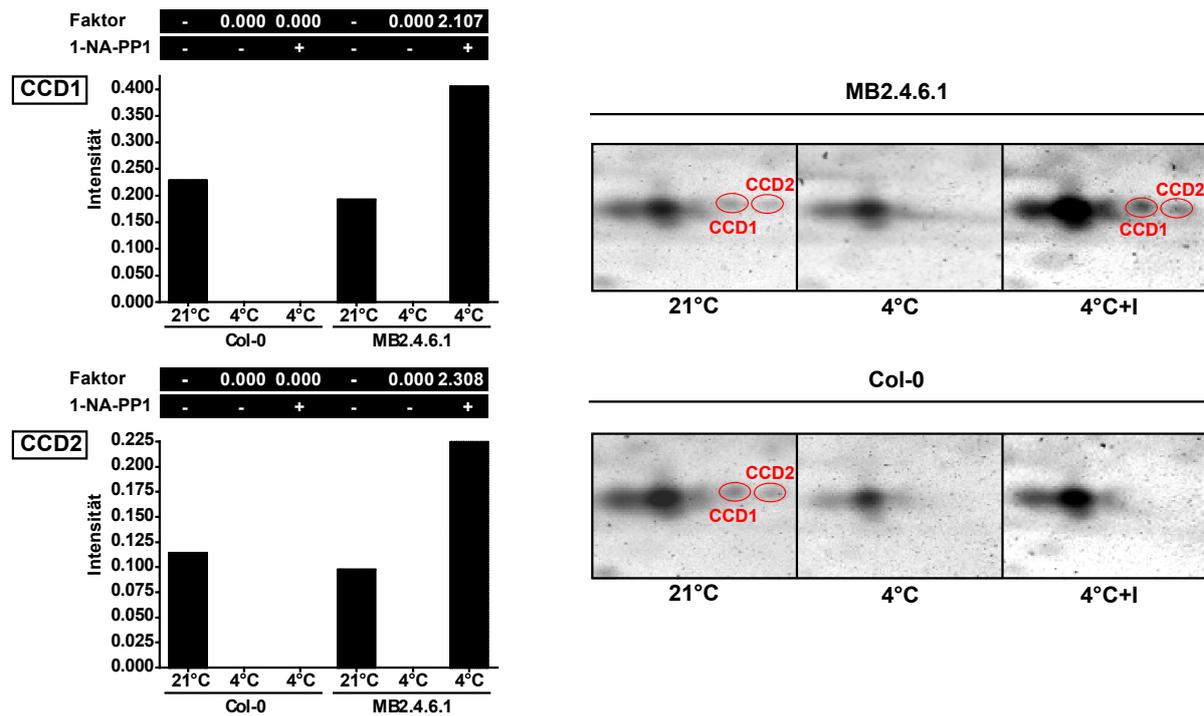
Neben dem Einfluss des Inhibitors auf CBF3, der zuvor diskutiert wurde, scheint die Inhibitorgabe in Col-0 und MB2.4.6.1 unspezifisch zu einer leichten Erhöhung der Transkription von ZAT12 zu führen. Spezifische Unterschiede zwischen mit Inhibitor-behandelten Col-0 und MB2.4.6.1 Pflanzen sind nicht zu erkennen. Für solche Aussagen ist das Spektrum der analysierten Gene aber zu gering.

3.2.5.2 Phosphoregulation von Signalproteinen

Der Ausfall einer Kinaseaktivität hat einen Effekt auf molekularer Ebene, da Zielproteine nicht mehr durch die entsprechende Kinase phosphoryliert werden können. Um zu versuchen.

diese Unterschiede im Phosphorylierungsmuster aufzudecken, wurde ein „Multiplex Proteomics“-Ansatz genutzt. Aus Col-0- und MB2.4.6.1-Pflanzen wurde nach Kältestress Gesamtprotein extrahiert und auf 2D-Gelen aufgetrennt. Phosphorylierte Proteine wurden mit dem Farbstoff ProQ-Diamond (Molecular Probes) angefärbt, Gesamtprotein wurde durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Um die Vergleichbarkeit von Col-0 und MB2.4.6.1 in der Kältestressantwort zu untersuchen, wurden die 2D-Gele der nicht-inhibierten 4 °C-Proben und der 21 °C-Kontrollen einander gegenübergestellt. Als obere und untere Grenze für unterschiedliche Phosphorylierungsstärken wurde ein Faktor 2 bzw. 0,5 als Grenze gesetzt. Innerhalb dieser Grenzen zeigten 82 % bzw. 86 % der identifizierten Proteine vergleichbare Phosphorylierungsstärken in beiden Linien. Diese Proteine wurden in Bezug auf die Inhibitorgabe weiter untersucht. Eine biologische Wiederholung des Experiments müsste zeigen, ob die beobachteten Unterschiede in den Phosphorylierungsmustern abhängig von einer verminderten AtCPK1-Funktion in der MB2.4.6.1 Linie sind, oder auf technischen Aspekten beruhen.

A



B

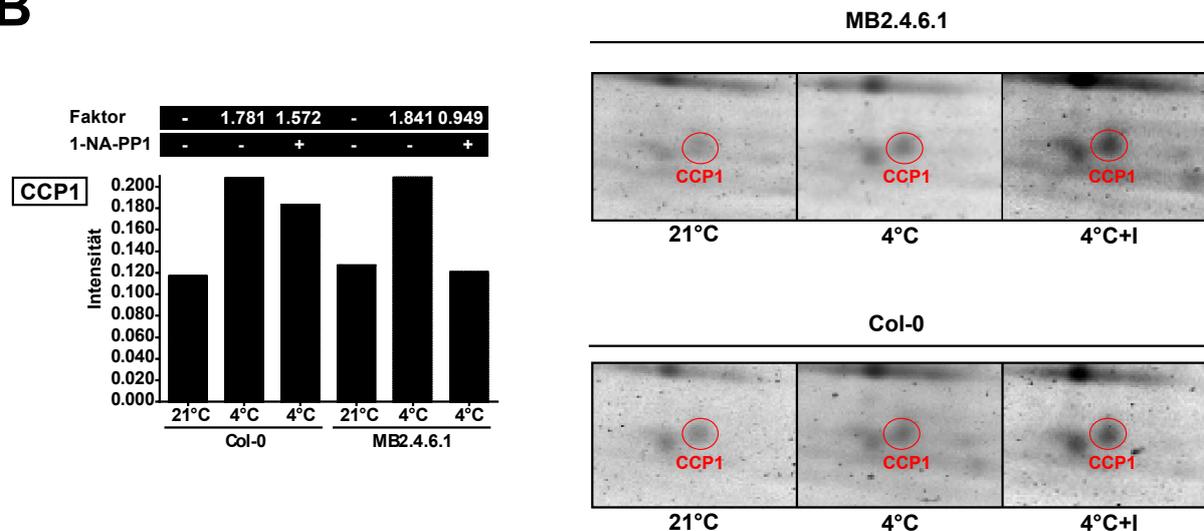


Abbildung 3-21 Kältestress- und AtCPK1-abhängige Dephosphorylierungen (cold-stress and CPK1-dependent dephosphorylation, CCD) und Phosphorylierungen (cold-stress and CPK1-dependent phosphorylation, CCP). Pflanzen wurden einer Temperaturveränderung ausgesetzt (Abbildung 3-20). Daraus wurde Gesamtprotein extrahiert (Wang *et al.*, 2003) und in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Färbung mit ProQ-Diamond (Molecular probes) wurden Unterschiede im Phosphoproteom der Linien MB2.4.6.1 und Col-0 vor und nach Kältestress in Abhängigkeit von der Inkubation mit 1-NA-PP1 gesucht. Die Intensität der Färbung spiegelt den Grad der Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Gesamtproteinkonzentration wieder. Dargestellt sind Signale, bei denen es ausschließlich in der MB2.4.6.1 Linie nach 1-NA-PP1 Behandlung zu einer Veränderung im Phosphorylierungsmuster gekommen ist. Auf den Gelbildern ist die Lage der Signale auf den 2D-Gelen wiedergegeben. In den Histogrammen ist die Intensität der Signale nach Normalisierung der Gele und die Veränderung der Phosphorylierungsrate (Faktor) relativ zur 21°C Kontrolle angegeben.

Signalerkennung und Normalisierung der 2D-Gele wurden mit der Software Proteomweaver durchgeführt. A) Gezeigt sind zwei Signale (CCD1 und CCD2), die auf eine Kälte- und AtCPK1-abhängige Dephosphorylierungen hinweisen. B) Ein Signal (CCP1) deutet auf eine Kälte- und AtCPK1 abhängig Phosphorylierung hin.

Die analytische Auswertung der Gele ergab Veränderungen im Phosphorylierungsmuster: so konnten fünf Proteine identifiziert werden, die in der Linie MB2.4.6.1 bei 1-NA-PP1 Behandlung nach Kältestress weniger stark dephosphoryliert werden. Zwei Beispiele für einen solchen Fall sind in Abbildung 3-21 A wiedergegeben. Beide Signale haben ein Molekulargewicht von jeweils etwa 23,5 kDa, unterscheiden sich aber leicht in ihren pI-Werten. Es könnte sich hierbei um zwei Phosphorylierungszustände eines Proteins handeln. In der Linie MB2.4.6.1 zeigte sich nach 1-NA-PP1 Inkubation, verglichen mit der 21 °C-Kontrolle, eine verstärkte Phosphorylierung beider Signale. In Col-0 kam es in diesen Fällen mit und ohne Inhibitor zur Dephosphorylierung. Weiterhin konnte für ein Protein von circa 46,3 kDa eine differentielle Phosphorylierung beobachtet werden. Dies entsprach zwar nicht dem Kriterium einer mindestens 2-fach stärkeren Phosphorylierung, soll aber hier erwähnt werden, um exemplarische beide Fälle zu diskutieren. Dieses Signal kann zwar in allen Proben nachgewiesen werden, zeigt aber in der 4 °C-Probe der MB2.4.6.1-Linie nach Inhibitorgabe eine deutlich geringere Phosphorylierung. In drei weiteren Fällen verursachte die Zugabe des Inhibitors eine differentielle Phosphorylierung in beiden Linien (nicht gezeigt). Dies beruht vermutlich auf der hohen Inhibitorkonzentration.

3.2.5.3 Messung der Veränderungen im Metabolom

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Anpassung an Kältestress sind Veränderungen im Metabolom der Pflanzen. Es wurde beschrieben, dass von den 497 detektierbaren polaren Metaboliten mit niedrigem Molekulargewicht die Konzentration von 311 Komponenten sich nach Kältestress ändert (Kaplan *et al.*, 2004). Davon zeigten 28 Metabolite bereits einen mehr als 2-fachen Anstieg nach 1 Stunde. Unter Verwendung von Gaschromatographie-Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit Wolfram Weckwerth, MPIMP Golm) konnten Vorstufen, Zwischenprodukte und Produkte verschiedener metabolischer Synthesewege gleichzeitig untersucht und quantifiziert werden. Dabei beschränkte sich die Analyse nicht nur auf bekannte Metabolite, sondern umfasste auch Massenspektrum-Signale, denen noch kein Metabolit zugeordnet werden konnte.

Im Gegensatz zu den Transkriptom- und Proteomanalysen wurde bei der Metabolomanalyse ein vergleichsweise schwacher Kältestress appliziert. Bereits eine Temperaturverringerung von 5 °C führte zu einer Veränderung von Metaboliten-Konzentrationen in der Zelle. Hydroponische Kulturen der Linie MB2.4.6.1 wurden wie zuvor beschrieben (s. 3.2.4.1) kultiviert und ein Kolben mit 100 µM 1-NA-PP1 behandelt. Dieser mit Inhibitor-behandelte und ein unbehandelter Kolben wurden auf 4 °C überführt und dort eine halbe Stunde luftgekühlt. Dies führte zu einer langsameren und schwächeren Verringerung der Temperatur als das Abkühlen im Eis/Wasserbad. Das Blattmaterial wurde wie zuvor eingefroren und homogenisiert. Aus je 20 mg Blattmaterial wurden Metabolite extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Bereits identifizierte Metabolite und deren Änderungen in Abhängigkeit von der Temperaturveränderung und Inhibitorgabe sind in einer Übersicht über die Synthesewege in Pflanzen in Abbildung 3-23 wiedergegeben.

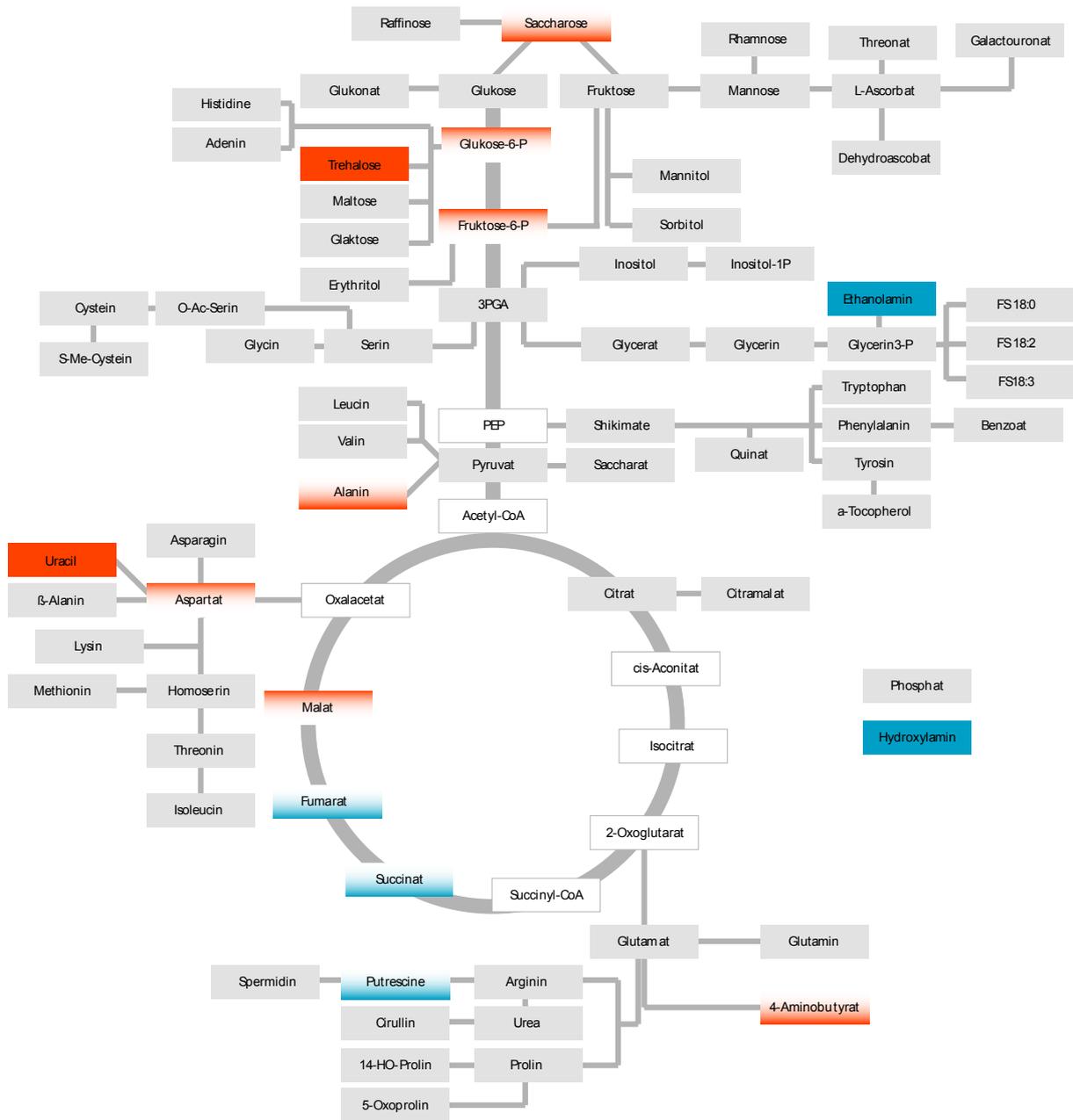


Abbildung 3-22 Veränderung der Metabolitenprofile nach Kältestress in Col-0 und MB2.4.6.1 in Abhängigkeit von 1-NA-PP1. Gezeigt sind Metabolitenprofile die sich nach Kältestress geändert haben. Metaboliten, die eine Veränderung $|\log_2| > 0,6$ zeigen, sind farbig hinterlegt. Ein roter Hintergrund zeigt eine Erhöhung der Metaboliten-Konzentration an, ein blauer eine Verringerung. In der oberen Hälfte des Hintergrundes sind die Veränderungen in unbehandelten Pflanzen, in der unteren Hälfte Veränderungen nach 1-NA-PP1 Behandlung dargestellt. Graue Hintergründe geben keine Veränderungen an, weiße Hintergründe zeigen an, dass diese Metaboliten nicht gemessen wurden.

Bei den analysierten Metaboliten handelt es sich um Metabolite des Primärmetabolismus. In der Metabolomanalyse konnten 8 Metabolite identifiziert werden, die in den unbehandelten Pflanzen nach Kältestress eine signifikante Konzentrationsänderung im Vergleich zu den

Kontrollpflanzen bei 21 °C zeigten. In sechs dieser Fälle kam es zu einer Konzentrationserhöhung, in zwei Fällen zu einer Verringerung der Konzentration. Bei vier der Metabolite blieb eine Konzentrationserhöhung nach Inhibitorbehandlung aus. In sechs weiteren Fällen kam es ausschließlich nach Inhibitorbehandlung zu einer Konzentrationsänderung von Metaboliten.

Eine genauere Analyse der Synthesewege zeigt, dass sich insgesamt neun dieser Metabolite zwei Synthesewegen zuteilen lassen, die durch die Inhibitorbehandlung differentiell reguliert werden. Ein Syntheseweg ist die Glykolyse, in der nach Kältestress ohne Inhibitorbehandlung eine Konzentrationserhöhung von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat beobachtet werden kann. Glukose-6-Phosphat wird durch die Phosphorylierung von Glukose durch das Enzym Hexokinase gebildet. Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat können reversibel durch die Phosphohexoisomerase ineinander überführt werden. Der nachfolgende Syntheseschritt wird durch die Phosphofruktokinase I katalysiert, einem der zwei Enzyme, über die die Glykolyse reguliert wird. Im Gegensatz zur Aktivierung dieses katabolischen Synthesewegs kommt es nach Inhibitorbehandlung zu einer Erhöhung der Saccharose-Konzentration, einem Zucker-Speicherstoff. Saccharose und Saccharose-Derivate sind die wichtigsten Transportformen der Kohlenhydrate in den Assimilat-Leitbahnen der Pflanze.

Der zweite Stoffwechselweg ist der Citrat-Zyklus und die davon abgehende Aspartat-Biosynthese. In den kältegestressten Pflanzen waren die Konzentrationen von Malat und Aspartat erhöht. Nach 1-NA-PP1-Behandlung kam es dagegen zu einer Konzentrationsverringerungen von Succinat und Fumarat. Die direkten Vorläufermetabolite von Succinat und der Übergang aus dem Citrat-Zyklus zur Aspartat-Biosynthese, Oxalacetat, konnten nicht gemessen werden. Die Reprimierung dieses Abschnitts des Citrat-Zyklus könnte der Grund für die differentielle Regulation der daraus synthetisierten Metabolite Malat und Aspartat sein. Mit und ohne Inhibitorbehandlung kam es dennoch zur Induktion der Synthese von Uracil.

Insgesamt zeigt diese Metabolom-Untersuchung, dass einige Kältestress-spezifische Biosynthesewege auch nach Inhibitorgabe noch in gleicher Weise wie in nicht-inhibierten Pflanzen reguliert werden. Dennoch gibt es Unterschiede, die zumindest in zwei Fällen auf eine differentielle Regulation einzelner Synthesewege schließen lassen. Biologische Wiederholungen dieses Versuchs unter Einbeziehung von Kontrollpflanzen der Linie Col-0 sind bereits in Vorbereitung, um unspezifische Nebeneffekte durch die Inhibitorgabe auszuschließen.

3.3 Phosphoregulation

Bei der biochemischen *in vivo* Aktivierung von CDPKs kommt es parallel zur Kalzium-Bindung zu Phosphorylierungen, die in einigen Fällen zu Konformationsänderungen des Enzyms führen. Diese Phosphorylierungen, so wird angenommen, dienen der Regulation der Kinaseaktivität. Ein Ziel dieser Arbeit war es, neben der funktionellen Charakterisierung von AtCPK1 und AtCPK2 auch die Regulation der beiden CDPK-Isoformen zu untersuchen. Autophosphorylierungsstellen in AtCPK1 waren bereits beschrieben worden (Hegeman *et al.*, 2004). Für AtCPK2 konnte bisher nur eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle identifiziert werden (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht). In dieser Arbeit sollte die Analyse von weiteren möglichen Phosphorylierungsstellen in AtCPK2 durchgeführt werden. Zusätzlich konnte eine bereits identifizierte Phosphorylierungsstelle in der ATP-Bindetasche von NtCDPK2 näher charakterisiert werden.

3.3.1 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in AtCPK2

Zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen wurde AtCPK2 in den Vektor pXCSG-StrepII kloniert und transient in *N. benthamiana* exprimiert. Die transiente Expression in *N. benthamiana* ist nicht nur deutlich schneller als die Herstellung transgener *Arabidopsis* Pflanzen, es ließen sich auch höhere Proteinmengen erzielen. Fünf Tage nach Infiltration in die *N. benthamiana* Blätter wurde Wasser in die Blätter injiziert. Dies stellte einen hypo-osmotischen Stresstimulus dar, der eine Proteinmodifikation verursacht und zur Aktivierung des Enzyms führt (A.-C. Cazalé und T. Romeis, unveröffentlicht). Anschließend wurde das Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und im Mörser aufgeschlossen. Die Proteine wurden in einer Abwandlung des ursprünglichen Protokolls (Witte *et al.*, 2004) an StrepTactin-Macroprep (IBA, Göttingen) gebunden und wahlweise mit Desthiobiotin-haltigem Elutionspuffer eluiert oder nach Erhitzen bei 95°C in SDS-Probenpuffer in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

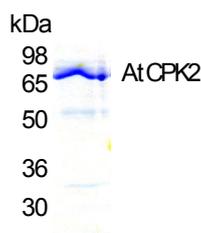


Abbildung 3-23 AtCPK2-StrepII Aufreinigung aus *N. benthamiana*.

Fünf Tage nach Infiltration in *N. benthamiana* wurde ATCPK2-StrepII an StrepTactin-Macroprep gebunden und nach dem Kochen in SDS-Probenpuffer in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Gezeigt ist das PageBlueTM-gefärbte Gel.

Die AtCPK2-Bande wurde ausgeschnitten und das Gelstück nach Alkylierung mit Trypsin-Gold für vier Stunden inkubiert. Von Macroprep eluiertes Protein konnte direkt mit Trypsin-Gold inkubiert werden. Die kurze Inkubationszeit führte zu unvollständig gespaltenen Peptiden, die aufgrund ihrer Größe zum Teil einfacher zu detektieren waren, als die kürzeren vollständig gespaltenen Peptide. Im Anschluss wurden die Peptide mit Nanospray-Tandem-MS (Fenn *et al.*, 1990; Wilm und Mann, 1996) in einem TripQuad Massenspektrometer analysiert. Die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen erfolgte durch einen manuellen Vergleich des erhaltenen MS-Spektrums mit einem Referenzspektrum, das durch eine virtuelle tryptische Spaltung der AtCPK2-Sequenz erzeugt wurde. Bei der Berechnung der virtuellen Peptidmassen wurden einfache und doppelte Phosphorylierungen von Peptiden berücksichtigt. Der Massenzuwachs eines phosphorylierten Peptids beträgt 80 Da/Ladungszahl des Peptids. Für ein 2-fach positiv geladenes Peptid ergibt dies einen Zuwachs von 40 Da. Durch einen Verlust des Phosphats kommt es zu einer Verringerung der Masse von 98 Da/Ladungszahl, da die Phosphatgruppe in Form von H_2PO_4^+ abgeht und so zusätzlich ein Wassermolekül fehlt.

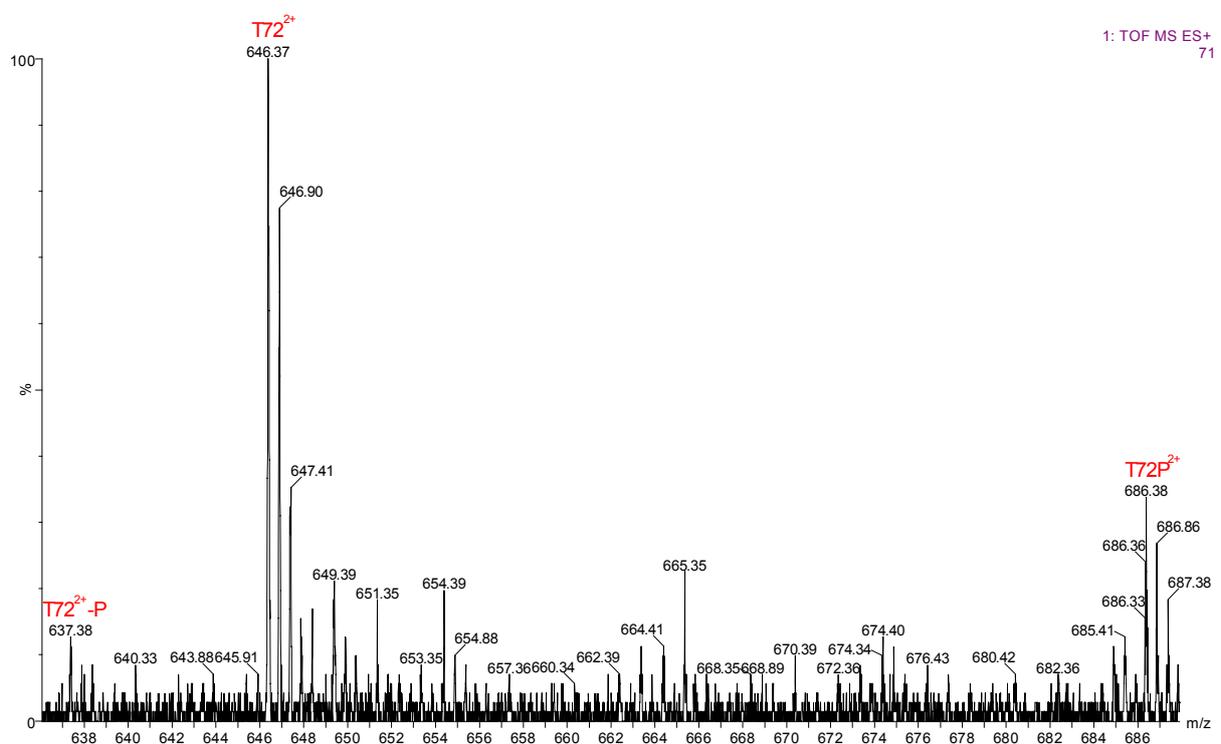


Abbildung 3-24 Bestimmung von phosphorylierten Peptiden in AtCPK2. Das Gelfragment mit der AtCPK2 Bande aus Abbildung 3-23 wurde mit Trypsin-Gold inkubiert und anschließend mit Nanospray-Tandem-MS analysiert. Das MS-Spektrum von 636 bis 688 m/z zeigt das doppelt geladene Peptid T72 in der nicht-phosphorylierten (T72; 646,37 Da), der phosphorylierten (T72P; 686,38 Da) und der dephosphorylierten (T72-P; 637,38 Da) Form.

In Abbildung 3-24 ist ein Ausschnitt aus dem MS-Spektrum von AtCPK2-StrepII dargestellt. Das Spektrum weist eine Massenverschiebung von 0,05 Da auf, woraus sich Unterschiede zu den theoretischen Massen ergeben. Zu erkennen ist die nichtphosphorylierte Form des Trypsin-Peptids T72, mit einer monoisotopen Masse von 646,37 Da (theoretisch 646,33 Da), die phosphorylierte Form (686,38 Da; theoretische 686,33 Da), mit einem Massenzuwachs von 40 Da, und das dephosphorylierte Peptid (637,38 Da; theoretisch 637,33 Da), das im Verhältnis zum phosphorylierten Peptid um 98 Da kleiner ist. Diese Werte sprechen für eine einfache Phosphorylierung des Peptids T72. Um die phosphorylierte Aminosäure zu identifizieren, wurde das Peptid mit Argongas fragmentiert (Spengler, 1997) und die Fragment-Ionen im MS/MS-Modus analysiert. Im Fragmentspektrum gibt es zwei für die Analyse wichtige Serien, die y-Serie und die b-Serie (Roepstorff und Fohlman, 1984; Johnson *et al.*, 1987). Die y-Serie beginnt mit der letzten Aminosäure, dem so genannten y1-Ion, das y2 Ion setzt sich dann zusammen aus der letzten und der vorletzten Aminosäure, und so weiter. Bei der b-Serie verhält es sich entgegengesetzt, hier ist das b1-Ion die erste Aminosäure.

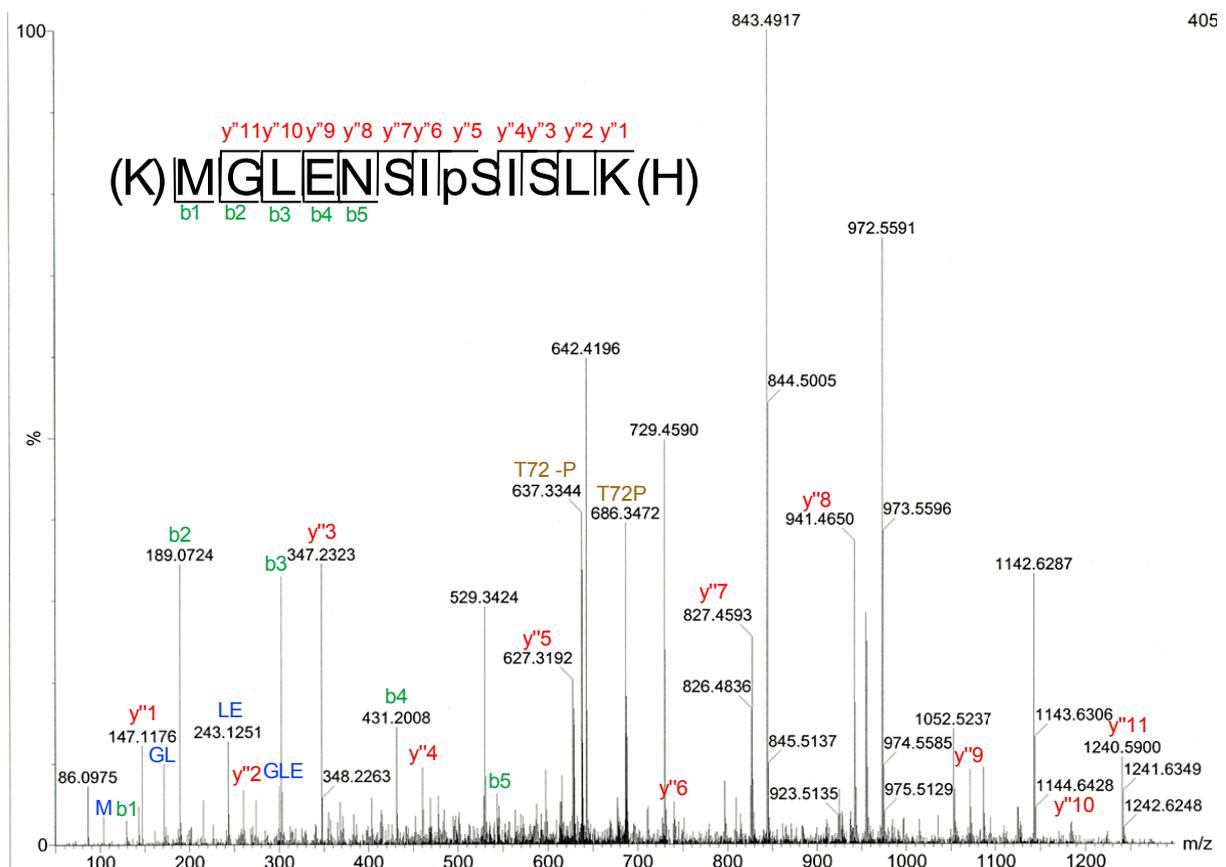


Abbildung 3-25 Bestimmung der phosphorylierten Aminosäure in dem Peptid T72P. In dem MS/MS-Spektrum von 50 bis 1300 Da sind die Fragmentionen des phosphorylierten Peptids T72P (686,38 Da) dar-

gestellt (s. Abbildung 3-24). Die Signale sind markiert entsprechend der erwarteten Massen der Fragmentionen der y-Serie (rot), b-Serie (grün) und der internen Acyl-Ionen (blau) des an y5-phosphorylierten Peptids. Dargestellt ist auch das m/z-Signal des phosphorylierten (T72P; 686,35 Da) und des dephosphorylierten Peptids (T72-P; 637,33 Da). Beweise für die Phosphorylierung an Ser641 ergeben sich aus den y-Ionen y5 und y6.

Das Fragmentspektrum des phosphorylierten T72-Peptids ist in Abbildung 3-25 dargestellt. Sowohl die b-Serie, wie auch die y-Serie zeigen, dass es sich hier um ein einfach phosphoryliertes Peptid handelt. Ferner sind die phosphorylierte und dephosphorylierte Form des Peptids deutlich im Spektrum zu erkennen. Aus den y-Ionen y5 und y6 ist ersichtlich, dass Ser641 phosphoryliert ist, da diese Ionen eine Massenverschiebung von 80 Da zeigen.

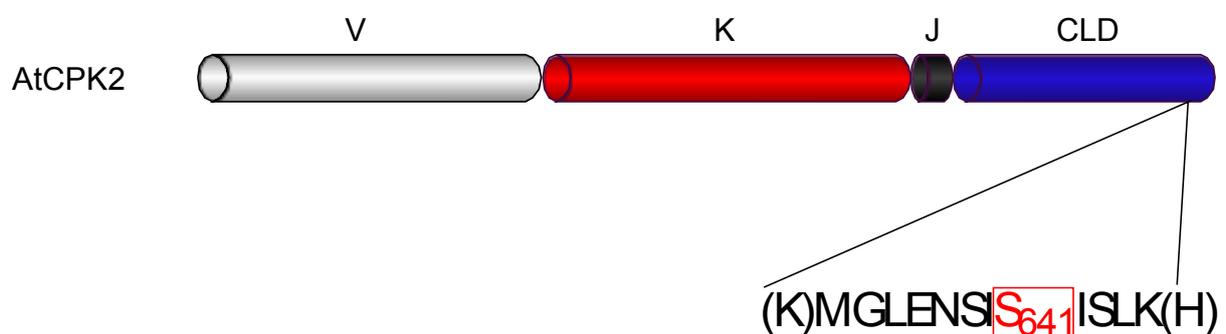


Abbildung 3-26 Position der Ser641-Phosphorylierung in AtCPK2. Dargestellt ist die Domänenstruktur von AtCPK2 (variable (V), Kinase- (K), ‚Junction‘- (J) und Calmodulin-ähnliche (CLD) Domäne) und das Peptid T72 mit der Phosphorylierungsstelle Ser641.

Im Folgenden wurde überprüft, ob es sich bei der Ser641-Phosphorylierung um eine konstitutive Phosphorylierung handelt, oder ob diese erst nach Stresstimulus auftritt oder verstärkt wird. Dazu wurde AtCPK2-StrepII in *N. benthamiana* exprimiert. Fünf Tage nach Transformation wurde als hypo-osmotischer Stresstimulus in die Hälfte der Blätter Wasser infiltriert. Die andere Hälfte blieb unbehandelt. Aus beiden Proben wurde AtCPK2 aufgereinigt und ein MS-Spektrum aufgenommen (s. Abbildung 3-24). Zur Analyse wurden beide Spektren anhand charakteristischer Signale im Spektrum normalisiert. Im direkten Vergleich von Probenmaterial gestresster Blätter mit Material nicht-gestresster Blätter ergibt sich ein klarer Unterschied im MS-Spektrum.

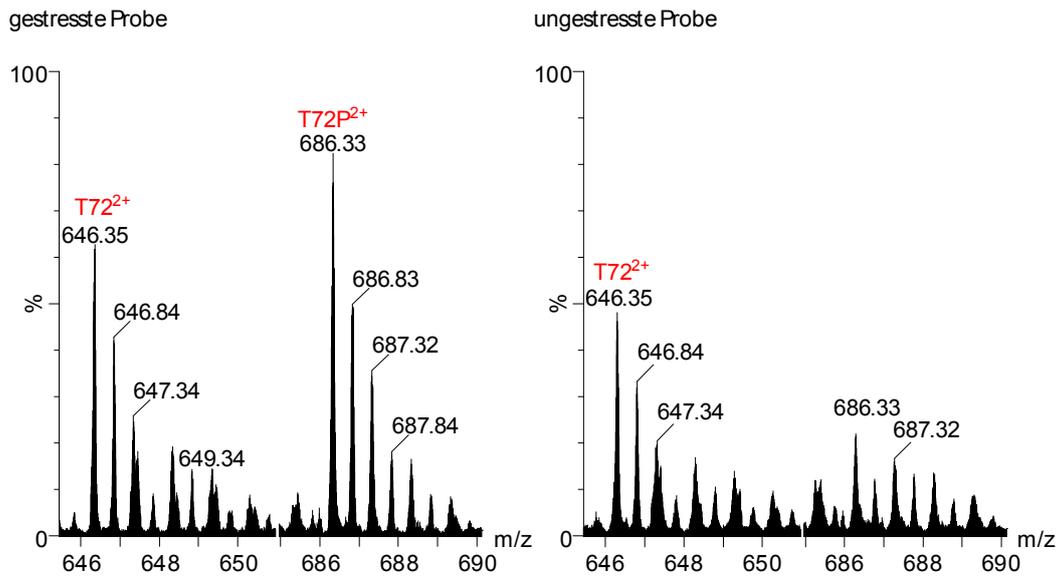


Abbildung 3-27 Vergleich der Ser641-Phosphorylierung in gestresstem und nicht-gestresstem Blattmaterial. Fünf Tage nach Transformation von AtCPK2-StrepII in *N. benthamiana* wurde in die Hälfte der Blätter Wasser infiltriert (gestresste Probe). Die andere Hälfte blieb unbehandelt (nicht-gestresste Probe). Aus beiden Proben wurde AtCPK2 aufgereinigt und ein MS-Spektrum aufgenommen (s. Abbildung 3-24). Gezeigt ist ein Ausschnitt aus den MS-Spektren von 645 bis 690 Da mit dem nicht-phosphorylierten Peptid (T72; 646.35 m/z) und dem phosphorylierten Peptid (T72P; 686,33 m/z).

Durch das natürliche Vorkommen unterschiedlicher Isotope für jedes Element, zeigt sich im Massenspektrum nicht nur die monoisotope Masse eines Peptids, sondern auch verschiedene Signale, die sich durch 1 Da/Ladungszahl von der monoisotopen Masse unterscheiden. Aus der natürlichen Verteilung der Isotope ergibt sich eine charakteristische Abnahme der Signalintensitäten von der monoisotopen Masse zu den höheren Signalen hin. In der gestressten Probe war diese Abnahme in 0,5 Da Schritten in der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form zu erkennen. In der nicht-gestressten Probe gab es ein Signal an der Position der monoisotopen Masse, es fehlten aber die charakteristischen zusätzlichen Signale. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem Signal nicht um das Signal der monoisotopen Masse der phosphorylierten Form handelt, sondern um Hintergrundsignale.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei der Ser641-Phosphorylierung um eine Stimulus-abhängige Phosphorylierung handelt. Eine Quantifizierung mittels Q-TOF Analyse ist ohne chemische Modifikationen selbst bei direktem Vergleich zweier unterschiedlich behandelte Proben allerdings sehr schwierig. Verschiedene Methoden zur Markierung von Phosphorylierungsstellen mit stabilen Isotopen würden aber inzwischen eine Quantifizierung (Glinski *et al.*, 2003; Hegeman *et al.*, 2004) erlauben und befinden sich zur Zeit in der Erprobung.

3.3.2 Autoinhibierende Phosphorylierung

Aus Phosphorylierungsuntersuchungen, für die NtCDPK2 in *E. coli* exprimiert worden ist, war bereits bekannt, dass Threonin 131 in der ATP-Bindetasche *in vitro* phosphoryliert werden kann (C.-P. Witte, J. Gielbert und T. Romeis, unveröffentlicht). Da *E. coli* keine Serin/Threonin-Kinasen besitzt, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um eine Autophosphorylierung handelt. Die Funktion dieser Phosphorylierung ist bisher jedoch nicht untersucht worden. Da sich die Aminosäure in unmittelbarer Nachbarschaft zur „Gatekeeper“-Aminosäure befindet, könnte eine Analyse dieser Phosphorylierungsstelle weitere Aufschlüsse über die Struktur und Funktion der ATP-Bindetaschen von CDPKs, sowie über deren mögliche Phosphoregulation geben.

NtCDPK2 autophosphoryliert nach Behandlung mit abiotischem oder biotischem Stress an Thr65 *in vivo*. Diese Phosphorylierung führt zu einer Mobilitätsverschiebung in der SDS-Gelelektrophorese. Es ist beobachtet worden, dass diese Phosphorylierung auch unter *in vitro* Bedingungen nicht vollständig ist. Autophosphorylierte und nicht-autophosphorylierte Fraktionen von NtCDPK2 wurden nach Inkubation mit ATP *in vitro* durch ihre Mobilitätsunterschiede in der SDS-PAGE getrennt und unabhängig voneinander im Nanospray-Tandem-MS analysiert. Dabei wurden im MS-Modus das unvollständig gespaltene Peptid T5-6, welches Thr65 enthält, und das Peptid T19, welches Thr131 enthält, untersucht.

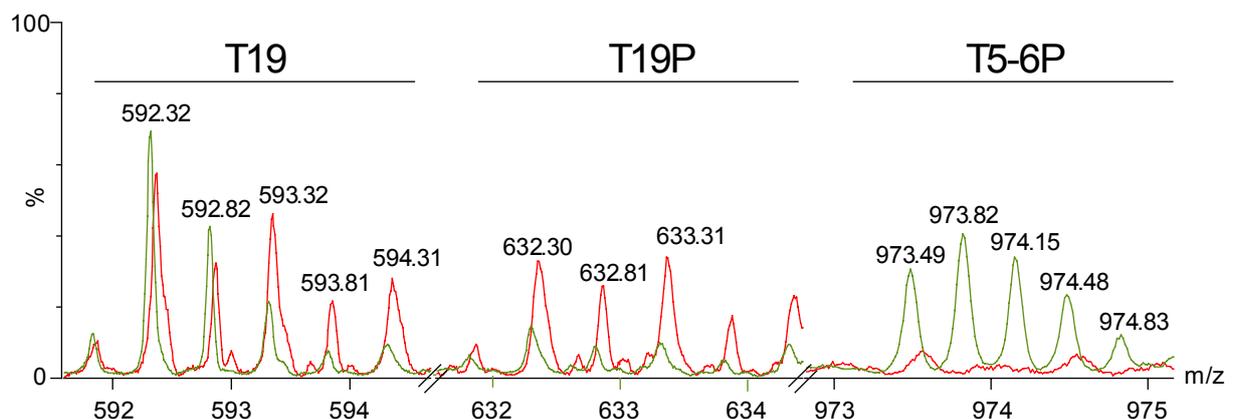


Abbildung 3-28 MS-Spektren von autophosphorylierter (grün) und nicht-autophosphorylierter (rot) NtCDPK2. NtCDPK2 wurde nach Expression in *E. coli* *in vitro* mit ATP inkubiert. Autophosphorylierte und nicht-autophosphorylierte Fraktionen wurden in einer SDS-Gelelektrophorese getrennt und unabhängig voneinander im Nanospray-Tandem-MS analysiert. Im MS-Spektrums von 973 bis 975 Da erkennt man die phosphorylierte Form des unvollständig verdauten Peptids (T5-6P; 973.63 Da), in dem Thr65 liegt. Im vorderen und mittleren Teil des Spektrums erkennt man die phosphorylierte Form (T19P; 632.4 Da) und die nicht-phosphorylierte Form (T19; 592.4 Da) des Peptids, in dem Thr131 liegt.

Die aufgenommenen MS-Spektren wurden durch den Vergleich von charakteristischen Massensignalen innerhalb des Spektrums normalisiert. Unter Vorbehalt der ungenauen Quantifizierung in MS-Spektren ohne Isotopenmarkierung zeigt ein Vergleich der beiden Spektren, dass sich die Phosphorylierungen an Thr131 und Thr65 reziprok zueinander verhalten. Bei einer Phosphorylierung an Thr65 ist die Phosphorylierungsrate von Thr131 geringer.

Eine phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form von Thr131 könnten durch eine gerichtete Mutagenese zum negativ-geladenen Aspartat bzw. zum nicht-phosphorylierbaren Valin simuliert werden. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Kinaseaktivität und die Autophosphorylierung von NtCDPK2-His wurden untersucht. Die entsprechend mutierten NtCDPK2-His Formen wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und nach Metallaffinitätschromatographie in einem Kinasetest mit Syntide2 als Substratpeptid und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als Phosphatdonor eingesetzt. Zusätzlich wurde in einer SDS-Gelelektrophorese das Mobilitätsverhalten untersucht.

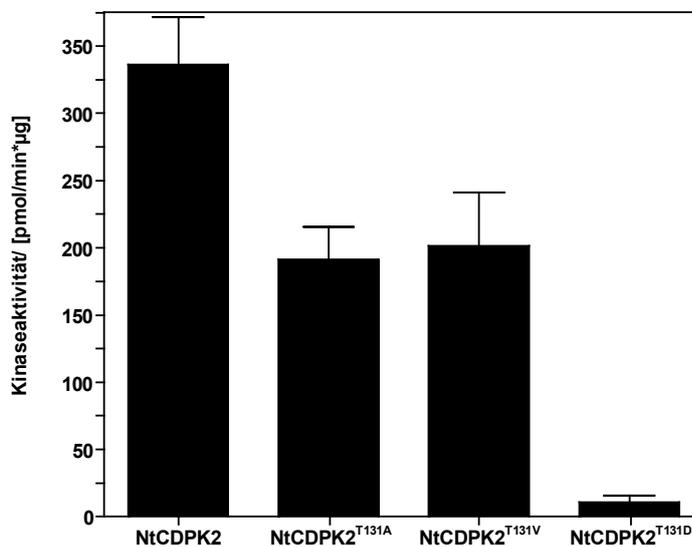


Abbildung 3-29 Kinaseaktivitäten der Thr131-Mutanten von NtCDPK2. NtCDPK2-His Wildtypenzym und Thr131-Mutanten wurden nach Expression in *E. coli* und Aufreinigung mittels Metallaffinitäts-Chromatographie in einem Kinasetest mit dem Substratpeptid Syntide2 und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als Phosphatdonor in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 für 10 Minuten inkubiert. Das Substrat wurde mit P-81 Anionenaustauscher-Papier gereinigt und der Einbau von ^{32}P durch Szintillationsmessung bestimmt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Doppelbestimmungen an.

Eine Mutation von Thr131 zu Aspartat führte zu einer fast vollständigen Inaktivierung von NtCDPK2. Nach dem Austausch zu Alanin und Valin zeigte sich eine verringerte Kinaseaktivität. Eine Wiederholung des Kinasetests mit 10 µM ATP, anstelle der zuvor eingesetzten 100 µM, führte in allen Mutationen zu einer Inaktivierung der Kinase (Daten

nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die geringeren Kinaseaktivitäten nach Mutation zu Alanin und Valin vermutlich auf einen geringeren K_M -Wert für ATP zurückzuführen sind.

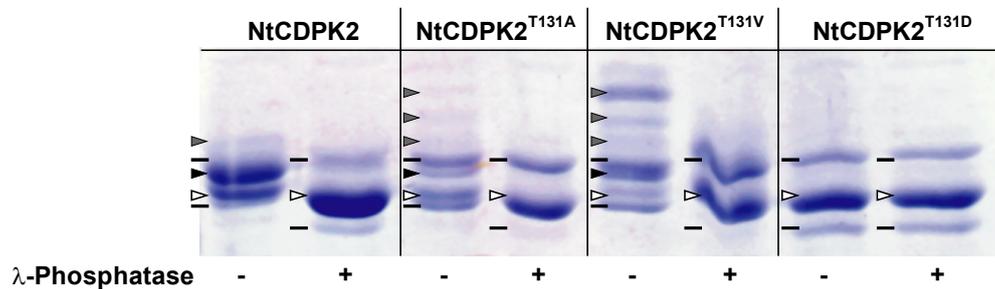


Abbildung 3-30 Mobilitätsverhalten der NtCDPK2 Thr131 Mutanten in der SDS-PAGE. Für die Untersuchung des Mobilitätsverhaltens wurden die Proteine aus *E. coli* mittels Metallaffinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Eine Hälfte der aufgereinigten Proteine wurde mit λ -Phosphatase inkubiert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit PageBlueTM angefärbt. Zu sehen ist ein Grundzustand des Enzyms (\blacktriangleright), die Thr65-phosphorylierte, aktivierte Form (\blacktriangleup), zwei Phosphorylierungs-unabhängige Banden ($_$) und weitere phosphorylierungs-abhängige Banden (\blacktriangleright).

Die eingeführten Mutationen änderten zudem signifikant das Mobilitätsverhalten in der SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 3-30). Das Wildtypenzym, NtCDPK2-His, zeigte nach Aufreinigung aus *E. coli* mindestens 5 verschiedenen Mobilitätsformen. Davon konnten zwei Formen nach Inkubation mit λ -Phosphatase in einen Grundzustand überführt werden (s. Abbildung 1-3). Die phosphorylierte Form, in der NtCDPK2 vorrangig vorlag, ist die an Thr65 phosphorylierte Form. Darüber hinaus gibt es eine weitere Phosphorylierungs-Form mit einem scheinbar höheren Molekulargewicht, die weitere Phosphorylierungen vermuten lässt. NtCDPK2^{T131D} liegt ausschließlich im Ruhezustand vor, was mit der Inaktivierung der Kinaseaktivität aus Abbildung 3-29 korreliert. NtCDPK2^{T131A} und NtCDPK2^{T131V} zeigen beide die Thr65-phosphorylierte Form sowie weitere mögliche Phosphorylierungs-Formen, die im Wildtypenzym nicht vorkommen.

Zusammengefasst zeigt dieses Experiment, dass es in den T131A und T131V-Mutationen zu einer Deregulation der Kinaseaktivität gekommen ist. Die biologische Funktion der Thr131-Phosphorylierung *in vivo* könnte somit zum Beispiel darin liegen, eine deregulierte Autophosphorylierung von NtCDPK2 zu verhindern.

Der Vergleich der Proteinsequenzen in Abbildung 3-7 zeigt, dass die Aminosäureposition, die dem Thr131 in NtCDPK2 entspricht, in allen CDPKs konserviert ist. Als Arbeitshypothese

wurde angenommen, dass eine Phosphorylierung an dieser Position der Regulation der Kinaseaktivität dienen könnte. Versuche, diese Phosphorylierung *in vivo* in AtCPK2 und AtCPK1 nach Expression in *N. benthamiana* zu identifizieren, sind bislang noch nicht gelungen. Dies könnte aber auch technische Ursachen in der MS-Analyse haben. Eine Mutation des analogen Thr200 in AtCPK2 zeigt jedoch, dass eine Mutation zu Aspartat ebenfalls zu einer fast vollständigen Hemmung der Kinaseaktivität führte (Abbildung 3-31).

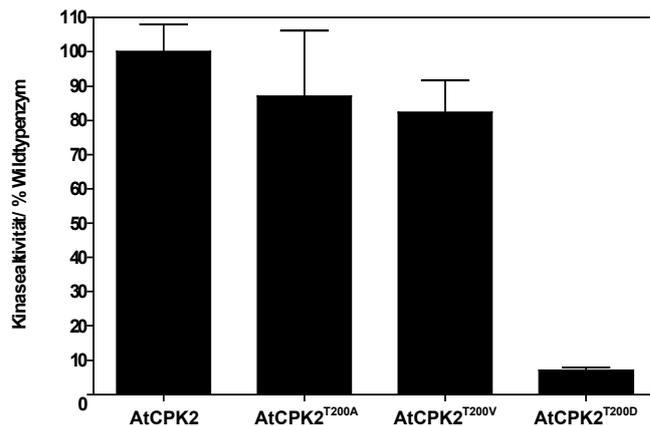


Abbildung 3-31 Kinaseaktivitäten von AtCPK2 und AtCPK2^{T200}-Mutanten. AtCPK2 Wildtypenzym und Thr200-Mutanten wurden in *N. benthamiana* exprimiert und mittels Macroprep-StrepTactin (IBA, Göttingen) aufgereinigt. In Kinasetests mit Syntide2 als Substratpeptid und [γ -³²P]-ATP als Phosphatdonor wurde die Kinaseaktivitäten *in vitro* bestimmt.

Die Identifizierung von weiteren CDPK-Isoformen mit einer Phosphorylierung an dieser Position ist ein vorrangiges Ziel, um die mögliche Rolle dieser Phosphorylierung in der Regulation der Kinaseaktivität zu klären. Kinetische Untersuchungen dieser Phosphorylierung in NtCDPK2 nach verschiedenen Stressestimuli könnten zudem zeigen, zu welchem Zeitpunkt diese Phosphorylierungsstelle in Bezug zur Thr65-Autophosphorylierung und zur Kalziumbindung phosphoryliert wird. Eine Identifizierung dieser Phosphorylierungsstelle *in vivo* in einer der CDPK-Isoformen aus *A. thaliana* würde zudem eine genetische Untersuchung durch Komplementation der entsprechenden T-DNA Insertionslinie erlauben.

4 Diskussion

4.1 Expressionsmuster von CDPKs

4.1.1 Gewebespezifische Expression

Angesichts der Fülle an möglichen Signalwegen, die eine Erhöhung der Kalziumkonzentration als Signalkomponente nutzen, stellt sich die Frage, wie passende Signalantworten zu den induzierenden Stimuli generiert werden können. Hier spielen neben anderen Faktoren eine intrazelluläre Lokalisation nahe den Quellen des Kalziumeinstroms wie auch die gewebespezifische Lokalisation der Kalzium-bindenden Proteine eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurden vier CDPKs aus drei phylogenetischen Untergruppen unter Berücksichtigung von Microarray-Expressionsdaten untersucht. Für zwei Isoformen wurden zudem stabile Promotor-GUS Linien in *A. thaliana* Col-0 generiert. Die Analyse der Expressionsdaten ergab, dass drei der untersuchten CDPKs, AtCPK1, AtCPK28 und AtCPK32, eine annähernd ubiquitäre Expression in der Pflanze zeigen. Im Gegensatz dazu war AtCPK2 in drei Zelltypen, die sich durch Spitzenwachstum auszeichnen, nämlich Pollen, Trichomen und Wurzelhaaren exprimiert. Zusätzlich zeigt AtCPK2 eine Expression in der Wurzelspitze. Die Promotor-GUS Linien konnten diese Expressionsmuster bestätigen und auf zellulärer Ebene deutlich erweitern. Aus den Microarraydaten war sowohl für AtCPK1 als auch für AtCPK2 eine insgesamt stärkere Expression in Wurzeln als in oberirdischen Pflanzenteilen bekannt. Durch eine Analyse der Promotor-GUS Linien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Isoformen auf zellulärer Ebene in unterschiedlichen Zellen der Wurzeln exprimiert sind. Während AtCPK1 vorwiegend im Zentralzylinder und in den Anlagen der Seitenwurzeln exprimiert ist, ist AtCPK2 in Wurzelhaaren und Wurzelspitze exprimiert. Für AtCPK2 konnten zudem regulatorische Elemente in der genomischen Region identifiziert werden, die verantwortlich sein könnten für die spezifische Expression.

Die Expression von AtCPK1 deutet auf eine Funktion in der Entwicklung neuer Pflanzenorgane hin. Dafür spricht die starke Expression in jungen Blättern, die im Laufe der Entwicklung abnimmt, und die Expression in den Anlagen neuer Seitenwurzeln. Die Untersuchung der *cpk1-2* Linie zeigt allerdings keine phänotypischen Auffälligkeiten in Bezug auf Blatt- oder Wurzelentwicklung. Dies könnte aber auch auf eine genetische Redundanz zurückzuführen sein, wobei eine andere CDPK teilweise die Funktion von AtCPK1 übernimmt.

4.1.2 Stressinduzierte Expression

Für NtCDPK2, der zu AtCPK1 und AtCPK2 homologen Isoform aus *N. tabacum*, konnte eine Erhöhung der Expressionsrate nach abiotischen Stresstimuli wie Verwundung und osmotischem Stress und nach biotischen Stresstimuli wie der „Gen-für-Gen“-Interaktion (Romeis *et al.*, 1999; Romeis *et al.*, 2001) gezeigt werden. Die Erhöhung der Transkription korreliert mit der Funktion von NtCDPK2 in der Integration abiotischer und biotischer Stresstimuli (Ludwig *et al.*, 2005). Eine Analyse der transkriptionellen Regulation nach verschiedenen Stresstimuli wurde für AtCPK1 und AtCPK2 durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Funktion dieser CDPKs zu ziehen (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1 Zusammenfassung der stressinduzierten Expressionsänderungen von AtCPK1 und AtCPK2.

Gezeigt sind die Änderungen der Expressionsraten und die Kinetiken dieser Änderungen nach abiotischen, chemischen, biotischen und Pathogen-induzierten Stressen. Die Daten der abiotischen, chemischen und biotischen Stresse stammen aus der Datenbank GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004), die Daten der Pathogen-induzierten Stresse stammen vom Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln (M. Bartsch und J. Parker, unveröffentlicht). Die Ergebnisse zu dieser Zusammenfassung befinden sich in Kapitel 3.1.3.

	Stress	AtCPK1		AtCPK2	
		Expressionsrate	Kinetik	Expressionsrate	Kinetik
Abiotische Stresse	Kältestress (Wurzel)	2×	progressiv	-	
	Trockenstress (Wurzel)	2×	transient	-	
	Verwundung (oberirdisch)	3×	transient	-	
Chemikalien	Cycloheximid	3×			
	6-Benzyl-Adenin	0,7×		0,15×	
Elizitoren	Syringolin	2×		5,3×	
	Chitin	2×		-	
Avirulenz-Faktoren	<i>Pst</i> DC3000 (avrRpm1)	4×	transient	19×	progressiv
	<i>Pst</i> DC3000 (avrRps4)	1,7×	transient	13×	progressiv

4.1.2.1 Abiotischer Stress

Analysen von Microarray-Datenbanken nach abiotischen Stressen zeigen, dass es analog zu NtCDPK2, bei AtCPK1 in den oberirdischen Pflanzenteilen zu einer transienten Erhöhung der Transkription nach Wundstress kommt. In der Wurzel zeigte AtCPK1 eine Erhöhung der Transkriptionsrate nach Kälte- und nach Trockenstress. Die Kinetiken der Expressionsänderungen nach Kälte- und nach Trockenstress waren unterschiedlich. Nach Trockenstress

kam es zu einer schnellen transienten Erhöhung der Expression, beim Kältestress zu einem langsamen, progressiven Anstieg.

Untersuchungen von Transkriptionsprofilen zeigen, dass zu Beginn unterschiedlicher Stressantworten viele Gene gleich reguliert werden (Kreps *et al.*, 2002), erst im Laufe der Stressantwort werden die Expressionsänderungen spezifischer für einen Stressstimulus. Die schnelle, transiente Induktion von AtCPK1 nach unterschiedlichen abiotischen Stressstimuli, wie Verwundung, Trockenheit und Kälte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass AtCPK1 in allgemeinen Stresssignalwegen eine Rolle spielt.

Die unterschiedliche Regulation von AtCPK1 in Wurzel und oberirdischen Blatteilen korrelierte mit Transkriptom-Untersuchungen, die für differentiell exprimierte Gene in Wurzel und in oberirdischen Pflanzenteilen ebenfalls nur eine Übereinstimmung von etwa 14 % aufwiesen. Beispielsweise konnten Untersuchungen von Marc Knight (2002) zeigen, dass verschiedene Wurzelgewebe unterschiedlich auf Kältestress reagieren. Es kam in allen Geweben zu verschiedenen starken Erhöhungen der Kalziumkonzentration, mit einem Maximum im Pericambium, einem Bereich der Wurzel, in dem auch AtCPK1 exprimiert ist. Die Kalzium-Signaturen in den Geweben waren wiederum von der Rate der Temperaturabnahme pro Zeiteinheit und der absoluten Temperatur abhängig, so dass hier zelltypspezifisch eine ganz charakteristische Signatur erzeugt werden konnte, die spezifische Informationen über den induzierende Stressstimulus codieren könnte.

Die Kalziumantwort in der Zelle nach Kältestress ist eine biphasische Antwort. Es wird postuliert, dass sich zunächst die Membranfluidität ändert, wodurch es zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle von außen kommt. In einem zweiten Schritt wird der Kalziumeinstrom aus internen Quellen, wie der Vakuole, fortgesetzt. An diesem zweiten Schritt sind wahrscheinlich Phosphatasen und Kinasen beteiligt (Monroy *et al.*, 1998; Knight, 2002). Von den zwei vorrangigen Kalziumsensoren in Pflanzen, Calmodulin und CDPKs, konnte durch Silencing und in Überexpressionsansätze gezeigt werden, dass Calmodulin einen negativen Effekt auf die Expression von Kälte-induzierbaren Genen hat (Knight, 2002). Eine Reihe von CDPKs aus verschiedenen Pflanzen zeigten zudem eine Transkriptionsänderung nach Kältestress: ZmCDPK1 wird durch Kälte induziert (Berberich und Kusano, 1997), OsCDPK7 wird durch hohe Salzkonzentrationen und Kälte induziert (Saijo *et al.*, 2000), MsCK1 wird

durch Kälte induziert, während MsCK2 reprimiert wird (Monroy und Dhindsa, 1995) und OsCDPK13 wird durch Kälte und Gibberellinsäure (GA) induziert (Abbasi *et al.*, 2004).

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine Rolle von CDPKs in der Kälte-abhängigen Kalzium-Signaltransduktion hin. Für OsCDPK7 und OsCDPK13 konnte dies durch Überexpressions-Experimente bestätigt werden. Transgene Pflanzen, die OsCDPK7 und OsCDPK13 überexprimierten, zeigten eine erhöhte Kältetoleranz (Saijo *et al.*, 2000; Abbasi *et al.*, 2004). OsCDPK7-überexprimierende Reispflanzen zeigten zusätzlich erhöhte Toleranz gegenüber Trockenheit. Die Erhöhung der Expression von AtCPK1 nach Trocken- und Kältestress birgt Parallelen zur Induktion von OsCDPK7, so dass auch hier ähnliche biologische Funktionen vermutet werden könnten.

Insbesondere zeigt aber OsCDPK13 eine hohe funktionelle Ähnlichkeit zu AtCPK1. OsCDPK13 ist ebenfalls in jungen Blättern exprimiert und spielt vermutlich eine Rolle in der Expansion, Elongation und Teilung der Zellen. Die Transkription von OsCDPK13 antisense RNA führte zu einem Zwergenphänotyp in transgenen Reispflanzen (Abbasi *et al.*, 2004). Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Funktion von OsCDPK13 in der GA-Signaltransduktion sein. Experimente mit NtCDPK2-VK, exprimiert in *A. thaliana*, zeigten ebenfalls eine extreme Reduktion der Pflanzengröße (S. Heimstädt und T. Romeis, unveröffentlicht). Auch hier könnte eine Rolle von NtCDPK2 in der GA-Signaltransduktion verantwortlich sein. In *Arabidopsis* Samen konnte eine direkte Verbindung zwischen Temperaturveränderungen und GA-Signaltransduktion nachgewiesen werden (Yamauchi *et al.*, 2004), somit könnte die Funktion von OsCDPK13 in der Kältestressantwort ein Nebeneffekt der Rolle in der GA-Signaltransduktion sein (Abbasi *et al.*, 2004).

4.1.2.2 Chemikalien

AtCPK1 zeigte eine Verdreifachung der Expressionsrate nach Behandlung mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid. In Säugerzellen konnte beobachtet werden, dass Kinasen, die durch verschiedene Stresse aktiviert werden, oft auch durch Cycloheximid induziert wurden (Cano *et al.*, 1994; Zinck *et al.*, 1995). Es ist zudem gezeigt worden, dass Proteinsyntheseinhibitoren die transiente Induktion der Proto-Onkogene *c-jun* und *c-fos* erhöhen und verlängern (Edwards und Mahadevan, 1992). Dieses Phänomen wurde Superinduktion genannt und wird normalerweise als sekundärer Effekt des Translationsarrestes betrachtet. Edwards und Mahadevan (1992) haben eine alternative Erklärung für die Wirkung von Cycloheximid vorgeschlagen. Sie nahmen an, dass Cycloheximid Komponenten der Transkription aktivieren kann durch Interaktion mit Molekülen aus der intrazellulären

Signaltransduktion. Für ZmCDPK1 aus Mais ist eine Induktion durch Cycloheximidbehandlung ähnlich wie für AtCPK1 gezeigt worden. Zusätzlich wurden zwei weitere kälteinduzierte Komponenten ZmCDPK1-abhängig durch die Cycloheximidgabe induziert. Berberich und Kusano (1997) haben daraus die Hypothese gebildet, dass ein alternativer Mechanismus zu Induktion von kälteabhängigen Genen existieren könnte, der zumindest teilweise durch ZmCDPK1 reguliert wird. Wenn ein analoger Mechanismus für AtCPK1 existiert, könnte vermutet werden, dass die schnelle Induktion der Transkription von AtCPK1 nach abiotischen Stressen als Signalgeber für die Induktion weiterer Komponenten dienen könnte.

4.1.2.3 Pathogen-Elizitoren und Gen-für-Gen-Interaktion

Durch die Funktion von NtCDPK2 in der Gen-für-Gen Interaktion, wurden auch Pathogen-induzierte Transkriptionsveränderungen in AtCPK1 und AtCPK2 untersucht. Dabei muss unterschieden werden zwischen einer Rassen-unspezifischen Pathogenabwehr nach Elizitierung und einer Rassen-spezifischen Pathogenabwehr, wie der Gen-für-Gen Interaktion und der Elizitierung durch Pathovar-spezifische Effektoren. Viele pilzliche und bakterielle Elizitoren induzieren pflanzliche Abwehrreaktionen. Syringolin ist ein Pathovar-spezifischer, bakterieller, zyklischer Peptidelizitor, der von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* sekretiert wird (Amrein *et al.*, 2004). Chitin ist ein pilzlicher Zellwandbestandteil und wirkt als Rassen-unspezifischer Elizitor (Zhang *et al.*, 2002; Ndimba *et al.*, 2003; Ramonell *et al.*, 2005). Beide Elizitoren führten zu einer geringen Erhöhung der Expressionsrate in AtCPK1. Dahingegen führte nur der Pathovar-spezifische Effektor Syringolin zu einer deutlichen Erhöhung der Expression in AtCPK2. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Untersuchung nach Behandlung mit dem Rassen-unspezifischen, bakteriellen Elizitor Flg22, ein Peptid, das sich von dem bakteriellen Flagellin ableitet und für Pflanzen als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) diskutiert wird. Flg22 führt zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate in AtCPK1, aber nicht in AtCPK2 (Navarro *et al.*, 2004).

A. thaliana Col-0 Pflanzen wurden mit *Pst* DC3000 (avrRps4) und *Pst* DC3000 (avrRpm1) inkubiert (M. Bartsch und J. Parker, MPIZ Köln). Die Gen-für-Gen Interaktion verursachte eine Erhöhung der Transkription von AtCPK1 und AtCPK2. Die Erhöhung der Transkription war in AtCPK2 jedoch deutlich stärker als in AtCPK1. Auch die Kinetiken der Expressionsänderungen waren unterschiedlich. AtCPK1 zeigte eine deutlich schnellere, transiente Änderung der Expression. Die Expressionslevel von AtCPK2 stiegen bis zu sechs Stunden nach Elizitorbehandlung noch immer an.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass AtCPK1 durch verschiedene Pathogensignale transient induziert wird. Die Induzierbarkeit nach einer Vielzahl von verschiedenen Stressstimuli korreliert mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse nach abiotischem Stress, und zeigt, dass AtCPK1 an sehr unterschiedlichen zellulären Prozessen von der Entwicklung neuer Pflanzenorgane, über abiotische Stressantworten, wie der Kältestressantwort, bis zur Pathogenabwehr beteiligt sein könnte. Um die biologische Funktion von AtCPK1 auf molekularer Ebene experimentell zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit AtCPK1 in einem chemisch-genetischen Ansatz zunächst nach Kältestress untersucht (s. 4.2.5).

AtCPK2 wird im Gegensatz dazu überwiegend von Rassen-spezifischen Elizitoren oder durch einige biologische Interaktionen mit Pathogenen (Gen-für-Gen) induziert. Grant *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Gen-für-Gen Interaktion AvrRpm1/Rpm1 zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Diese führte wiederum zur Aktivierung einer NADPH-Oxidase und nachfolgender HR. Damit zeigen sich Parallelen zur Funktion von NtCDPK2 in der Gen-für-Gen Interaktion. Hier wurde vermutet, dass die Aktivierung einer NADPH-Oxidase zu der HR führt, die die Überexpression von NtCDPK2-VK in Pflanzen auslöst (Ludwig *et al.*, 2005). AtCPK2 könnte diese Funktion in den Wurzelhaaren und Trichomen in *A. thaliana* übernehmen. Zusätzlich zu einer Rolle in der Rassen-spezifischen Pathogenabwehr deuten die gewebespezifischen Analysen mit den Promotor-GUS Linien auf eine Funktion im Spitzenwachstum hin (s. nächstes Kapitel).

4.1.3 Biologische Funktion von AtCPK2 im Spitzenwachstum

AtCPK2 zeigt eine Expression in Wurzelhaaren, Trichomen und Pollenkörnern. Pollenkörner bieten ein einfaches Modellsystem zur Analyse des Spitzenwachstums. Der Einfluss von AtCPK2 auf die Pollenentwicklung und die Ausbildung von Pollenschläuchen wurde daher bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen untersucht.

Die Expression von AtCPK2 in Pollen ist im Vergleich zu anderen Pollen-spezifisch-exprimierten CDPKs recht schwach. Zudem zeigt AtCPK2 keinen Anstieg der Transkription von bizellulärem zu trizellulärem Pollen (Honys und Twell, 2003). Dies gab bereits einen Hinweis darauf, dass AtCPK2 keine essentielle Rolle in der Pollenentwicklung spielen könnte. Die Untersuchung der Keimfähigkeit der Pollenkörner von Col-0 und *cpk2-1* Pflanzen mittels FDA-Färbung und *in vitro* Keimungstest ergab dann auch, dass die Lebensfähigkeit und die Keimungsrate des *cpk2-1*-Pollens gegenüber Wildtyppollen nicht verändert sind. Bei

der Bestimmung der Pollenschlauchlänge der *cpk2-1* Linie ergab sich bei einer Kalziumkonzentration von 5 mM jedoch eine Reduktion von 40 % im Vergleich zu Wildtyppollen. Die optimale Kalziumkonzentration zur *in vitro* Keimung liegt bei circa 2 mM. Bei höheren Konzentrationen konnte eine Keimhemmung beobachtet werden. Das Experiment zeigte, dass die inhibierende Wirkung in der *cpk2-1* Mutante bereits bei einer niedrigeren Kalziumkonzentration einsetzte, als in Wildtyppollen.

Wurzelhaare und Trichomen entstehen durch Spitzenwachstum von Rhizodermiszellen bzw. Epidermiszellen. Bei den Pollen dient das Spitzenwachstum des Pollenschlauchs der Befruchtung der Eizelle. Während des Spitzenwachstums wird konstant neues Zellwandmaterial synthetisiert und zur Zellspitze transportiert. An der Spitze akkumulieren Vesikel mit Zellwand-Polysacchariden und -Proteinen. Die Vesikel entstehen im rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) und in Dictyosomen. Beide Zellorganellen akkumulieren in den Wurzelhaaren direkt hinter der wachsenden Spitze. Sowohl das Wachstum von Pollenschläuchen wie auch das von Wurzelhaaren sind dabei Kalzium-abhängige Prozesse (Brewbaker und Kwack, 1963; Wymer *et al.*, 1997). Es ist gezeigt worden, dass ein intrazellulärer Kalziumgradient von der Spitze zur Basis existiert, der maßgeblich für Geschwindigkeit und Richtung des Spitzenwachstums verantwortlich ist (Jaffe *et al.*, 1975; Obermeyer und Weisenseel, 1991; Rathore *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992). Der Gradient entsteht durch den Einstrom von Kalzium an der Pollenschlauchspitze und durch die Aufnahme des Kalziums hauptsächlich ins ER (Jaffe *et al.*, 1975). Der Kalziumgradient ist erforderlich für die zytoplasmatische Strömung und die Exozytose von Vesikeln und für die Struktur des Zytoskeletts. Eine Erhöhung der Kalziumkonzentration an der Spitze führt zu zytoplasmatischen Strömungen und der Akkumulation und Fusion von Vesikeln (Pierson *et al.*, 1994), was das Spitzenwachstum verlangsamt oder stoppt. Für AtCPK2 ist mit biochemischen Methoden eine Myristoylierungs-abhängige Lokalisation im ER bestimmt worden (Lu und Hrabak, 2002). AtCPK2 könnte somit eine Rolle in der Erzeugung oder Aufrechterhaltung des Kalziumgradienten spielen, indem das Enzym am ER die Kalziumaufnahme reguliert. Moutinho *et al.* (1998) konnten zeigen, dass eine Kalzium-abhängige Proteinkinaseaktivität vermutlich für die Richtung des Pollenschlauchwachstums verantwortlich ist. Lokalisiert wurde diese Aktivität in der Pollenschlauchspitze, also in der Nähe des ER. Die intrazelluläre Lokalisation von AtCPK2 in Pollenschläuchen ist noch nicht untersucht worden. Erste Lokalisationsstudien von AtCPK2-YFP in Trichomen zeigten allerdings eine intrazelluläre Lokalisation in den Spitzen der Verzweigungen, die vergleichbar

ist mit der Lokalisation des ER in Pollenschläuchen. Neben einem stabilen Kalziumgradienten sind auch Kalzium-Oszillationen während des Pollenschlauchwachstums beschrieben worden (Trewavas, 2000). Die Oszillationen entstehen vermutlich durch abwechselnde Aufnahme und Abgabe von Kalzium in das und aus dem ER. Auch in diesem Zusammenhang wäre eine biologische Funktion von AtCPK2 denkbar.

4.2 Chemisch-Genetische Analyse von AtCPK1 und AtCPK2

Chemisch-genetische Analysen von Kinasen sind bislang nicht für multizelluläre Organismen beschrieben worden. Bisherige Versuche beschränkten sich auf Hefe oder Zellkulturen (zusammengefasst in Zhang *et al.*, 2005). *Arabidopsis thaliana* eignet sich aus mehreren Gründen als pflanzlicher Modellorganismus besonders gut für die Anwendung der chemisch-genetischen Methode in höheren Organismen. Zum einen sind defiziente Linien für eine Reihe von Kinasen vorhanden, die durch ATP-Bindetaschenvarianten komplementiert werden können. Zum anderen könnte der Inhibitor in Pflanzen mit den Wurzeln aufgenommen werden und sich schnell in der gesamten Pflanze verbreiten. Weiterhin sind, basierend auf dem vollständig sequenzierten Genom, Microarrays vorhanden und es gibt Referenzdatenbanken für 2D-Gelanalysen. Dadurch ist es möglich, nach Transkriptom- und Proteom-Analysen die beteiligten Gene oder Proteine zu identifizieren (Ndimba *et al.*, 2003; Nühse *et al.*, 2004; Reddy und Reddy, 2004; Peck, 2005). Zudem sind Protokolle vorhanden, um das Metabolom im Hochdurchsatzverfahren zu untersuchen (Roessner *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2004; von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004; Schauer *et al.*, 2005). Mit Hilfe von GC-MS können bis zu 400 Metabolite pro Experiment in einem Lauf analysiert werden.

Da etablierte Methoden beschrieben wurden, Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Analysen durchzuführen, bietet die chemisch-genetische Methode in *A. thaliana* die Möglichkeit, nach externem Stressstimulus auf molekularer Ebene die biologische Aktivität von nativ exprimierten Kinasen zu untersuchen, deren Funktion noch nicht näher charakterisiert ist.

4.2.1 Identifizierung der „Gatekeeper“-Aminosäure

Die „Gatekeeper“-Aminosäure verhindert in Wildtypkinasen die Bindung des Inhibitors 1-NA-PP1 und des ATP-Analogons N⁶-Benzyl-ATP. Um hier durch eine gezielte Mutation die ATP-Bindetasche zu erweitern, wurde die Position der „Gatekeeper“-Aminosäure durch einen primären Sequenzvergleich identifiziert (Abbildung 3-7). In allen Organismen, die bislang untersucht wurden, handelt es sich vornehmlich um aromatische, polare oder aliphatische Aminosäuren, die sich durch große Seitenketten auszeichnen. In Pflanzen sind dies primär Tyrosin, Methionin, Phenylalanin und Leucin (Abbildung 4-1).

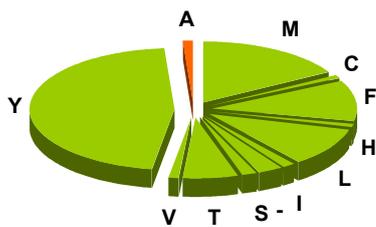


Abbildung 4-1 Verteilung der Aminosäuren an der „Gatekeeper“-Position in pflanzlichen Proteinkinasen. Gezeigt sind die Aminosäuren in der 1-Buchstaben Abkürzung.

Es gibt in Pflanzen in diesem Zusammenhang eine Besonderheit, die so in keinem anderen Organismus bislang beschrieben wurde. Es existiert eine kleine Familie von natürlich vorkommenden Analog-sensitiven Kinasen, bei denen die „Gatekeeper“-Aminosäure ein Alanin ist.

		<u>Kinasedomäne V</u>
CDPK2 [N. tabacum]	(150)	VAVHVVM E Y CAGGEL
At3g09240 [A. thaliana]	(90)	HERLLV A EYMPNETL
At5g01060 [A. thaliana]	(109)	NERLLV A EYMPNGTL
At4g35230 [A. thaliana]	(122)	DERLLV A EFMPNDTL
Proteinkinase [O. sativa]	(129)	DERLLV A EFMPNDTL
At5g46570 [A. thaliana]	(102)	DERLLV A EYMPNDTL
Proteinkinase [O. sativa]	(125)	DERLLV A EYMPNDTL
Proteinkinase [O. sativa]	(107)	DERLLV A EYMPNDTL
At1g01740 [A. thaliana]	(102)	GERLLV A EFMPNETL
At5g59010 [A. thaliana]	(101)	DERLLV A EFMPFETL
At3g54030 [A. thaliana]	(102)	EERLLV A EFMPHETL
Proteinkinase [O. sativa]	(102)	GERLLV A EFMPHETL
At1g63500 [A. thaliana]	(41)	EERLLV A EFMPNETL

Abbildung 4-2 Familie von natürlich vorkommenden Analog-sensitiven Kinasen aus Pflanzen.

Es wird angenommen, dass es sich dabei um einen Teil eines regulatorischen Mechanismus handeln könnte (Vazquez *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Cytokinine, die in ihrer Struktur große Ähnlichkeit mit 1-NA-PP1 aufweisen, an ATP-Bindetaschenmutanten binden und diese mit hoher Affinität inhibieren können. Für den Einsatz der chemisch-genetischen Methode in Pflanzen ergeben sich daraus zwei Schwierigkeiten. Zum einen könnte eine natürliche Analog-sensitive Kinase ebenfalls durch 1-NA-PP1 inhibiert werden. Dadurch ergeben sich bei allen Inhibitionsversuchen Hintergrundeffekte. Diese können jedoch durch den Vergleich mit Wildtyppflanzen, die ebenfalls mit Inhibitor behandelt werden, eliminiert werden. Zudem wäre es denkbar, dass Cytokinine die modifizierten CDPKs ebenfalls inhibieren. Autophosphorylierungsexperimente mit NtCDPK2^{M195A} in

Zellextrakt zeigten jedoch, dass NtCDPK2 auch unter diesen Umständen noch Aktivität besaß, und es zu keiner Inhibition kam.

4.2.2 Biochemische Charakterisierung

Um zur Substratmarkierung genutzt werden zu können, müssen die ATP-Bindetaschenvarianten drei Bedingungen erfüllen. Sie müssen in der Lage sein, N⁶-Benzyl-ATP als Phosphatdonor zu nutzen, eine geringere Bindungsaffinität für das Analogon als für ATP zeigen und eine vergleichbare Substratspezifität besitzen. Um zusätzlich defiziente Linien komplementieren zu können, sollten die Varianten *in vivo* zusätzlich noch eine vergleichbare Kinaseaktivität mit ATP als Phosphatdonor besitzen.

NtCDPK2 wurde zunächst stellvertretend für ein CDPK-Enzym analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Mutation M195A keine Auswirkungen auf die Kinaseaktivität hatte. Nach Mutation der „Gatekeeper“-Aminosäure (Abbildung 4-3) zu Glycin, kam es hingegen zur Inhibition der Kinaseaktivität.

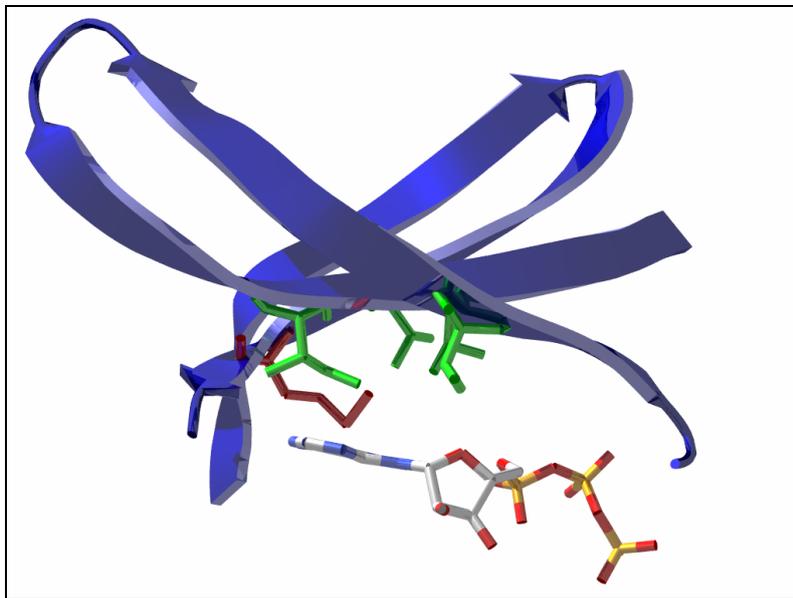


Abbildung 4-3 Räumliches Modell der ATP-Bindetasche von NtCDPK2. Die β -Faltblätter sind als Bänder dargestellt. Die „Gatekeeper“-Aminosäure (rot) und die vier Aminosäuren, die in Richtung des Nukleotids ausgerichtet sind (grün), sind in ihrer Struktur dargestellt.

Eine Mutation der „Gatekeeper“-Aminosäure zu Alanin hatte zudem keinen offensichtlichen Einfluss auf die Substratspezifität von NtCDPK2. Diese ermöglichte aber die Nutzung des ATP-Analogons N⁶-Benzyl-ATP und die Inhibition durch 1-NA-PP1. Als K_i -Werte für N⁶-Benzyl-ATP und 1-NA-PP1 konnten Werte im unteren Bereich bislang untersuchter Kinasen bestimmt werden (Shah *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Gillespie *et al.*, 1999; Kraybill *et al.*,

2002). Obwohl die Kinase-Domäne von NtCDPK2 hohe Homologie zu der von AtCPK1 (94,3 % ähnlich, 91,7 % identisch) und AtCPK2 (87,5 % ähnlich, 87,5 % identisch) aufweist, lag der K_i -Wert für 1-NA-PP1 von NtCDPK2 eine Zehnerpotenz niedriger. Auch die Wildtypform von AtCPK1 zeigte eine deutlich höhere Affinität für den Inhibitor. Dies lässt den Schluss zu, dass trotz der hohen Homologie keine Vorhersagen über die Auswirkungen der „Gatekeeper“-Mutation in einzelnen CDPK-Isoformen getroffen werden können.

4.2.3 Substratidentifizierung mittels N⁶-Benzyl-ATP

NtCDPK2^{M195A}-His bindet N⁶-Benzyl-ATP mit einer höheren Affinität als ATP, wie der Vergleich des K_i -Wertes in den Autophosphorylierungsversuchen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen zeigte. Die stark präferentielle Bindung sollte es ermöglichen, Kinasesubstrate in einem Zellextrakt zu phosphorylieren. Experimente, spezifische Kinasesubstrate von NtCDPK2 mit [γ -³²P]-N⁶-Benzyl-ATP zu markieren, sind dennoch bislang erfolglos geblieben. Eine Auswertung mittels SDS-PAGE ergab einen zu starken Hintergrund von unspezifischen Markierungen auch in Kontrollexperimenten ohne Zugabe von rekombinanter Kinase. Hierbei könnte es sich um Nukleotid-bindende Proteine handeln oder um die bereits vorher angesprochenen natürlichen Inhibitor-sensitiven Kinasen. Zusätzlich entstehen bei der chemo-enzymatischen Synthese des ATP-Analogons größere Mengen ³²P, das von einigen Enzymen umgesetzt werden könnte. Eine Erweiterung des Syntheseprotokolls durch Einsatz einer HPLC zur Isolierung des radioaktiv markierten ATP-Analogons könnte dieses Problem lösen. Eine andere Möglichkeit, eine höhere Sensitivität und Auflösung bei der Auswertung zu erhalten, ist der Einsatz von 2D Gelelektrophorese anstelle der eindimensionalen SDS-Gele. Dabei könnte die 2D-Gelelektrophorese durch Vorfraktionierungen ergänzt werden, um den Anteil an Kinasesubstraten zu erhöhen (Molloy *et al.*, 1998). Eine technisch sehr viel anspruchsvollere Methode ist von Allen *et al.* (2005) vorgestellt worden. Dabei werden Substratproteine durch eine ATP-Bindetaschenvariante mit einem ATP-Analogon- γ S als Phosphatdonor markiert und nach einer Derivatisierung mittels Immunopräzipitation angereichert. Die angereicherten Substratproteine werden direkt im Massenspektrometer identifiziert. Diese Vorgehensweise minimiert den Verlust an Substratproteinen bei der Aufreinigung aus dem 2D-Gel und erhöht signifikant die Sensitivität. Auf diese Weise können Kinasesubstrate identifiziert werden, die nur 0,005 % des Gesamtproteins ausmachen.

Es besteht die Möglichkeit, dass die membranständigen CDPKs nach Aufschluss der Pflanzen im Zellextrakt ihre natürlichen Substrate nicht mehr binden oder phosphorylieren können.

Eine Applikation des ATP-Analogons *in vivo* wäre der beste Weg, um Substrate unter natürlichen Bedingungen zu markieren. Entsprechende Methoden, um Nukleotide über Plasmamembranen zu transportieren, sind bereits in der Entwicklung (Meier, 2002). Ihre Applikation für Substratmarkierungen *in vivo* ist allerdings noch nicht untersucht worden. In Pflanzen ergibt sich durch die Zellwand ein weiteres Problem, so dass eventuell nur ein Einsatz in Protoplasten möglich wäre. Dennoch bietet diese Methode ein großes Potential für die Zukunft, Kinasesubstrate unter *in vivo* Bedingungen in der Pflanze zu untersuchen. Dabei würde sowohl die gewebespezifische wie auch die intrazelluläre Lokalisation von Kinasen und Substraten berücksichtigt werden. Zudem könnten verschiedenen Substrate nach verschiedenen Stimuli getrennt voneinander analysiert werden.

4.2.4 Etablierung chemisch-genetischer Versuche

Ziel dieser Arbeit war es, eine reverse chemisch-genetische Methode zur funktionellen Charakterisierung von CDPKs *in vivo* zu etablieren. Dazu musste zum einen eine Methode entwickelt werden, um die Pflanzen natürlich aufzuziehen und um gleichzeitig einfach und genau dosierbar den Inhibitor applizieren zu können. Zum anderen musste eine Inhibitor-konzentration gefunden werden, welche ausschließlich die ATP-Bindetaschenvarianten inhibiert. Die einfache Applikation von 1-NA-PP1 in Zellkulturen und Hefeexperimenten legte die Idee nahe, Pflanzen ebenfalls in hydroponischen Kulturen wachsen zu lassen. Häufig auftretende Probleme, wie ungenügende Wachstumsbedingungen, die sich durch Chlorosen in den Blättern zeigen, konnten durch eine Änderung der Aufzuchtbedingungen in der Klimakammer und durch Zugabe von Saccharose zum Medium gelöst werden. Der Inhibitor ließ sich durch Zugabe zum Medium applizieren, wo er von den Wurzeln aufgenommen wurde. Das Volumen an Medium, in dem die Samen ausgebracht wurden, diente als Referenz für die Berechnung der Inhibitor-Konzentration.

Bislang sind ausschließlich ATP-Bindetaschenmutanten von Kinasen untersucht worden, deren Funktion bereits bekannt war (zusammengefasst in Bishop *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Die Funktionalität der Kinasen und wirksame Inhibitor-Konzentrationen konnten durch Aktivitätstests bestimmt werden. Im Falle der hier verwendeten CDPKs gab es diese Möglichkeit nicht. Durch *in vitro* Experimente mit synthetischen Substraten konnten lediglich K_i -Werte für den Inhibitor bestimmt werden. Da sich Diffusionsraten in Zellkulturen und in multizellulären Organismen aber signifikant unterscheiden, ließ sich keine Korrelation zwischen ins Medium applizierter und intrazellulärer Inhibitor-konzentration ableiten.

Parallel zur funktionellen Charakterisierung von AtCPK1 wurden daher zwei unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen in Wildtypkulturen getestet. Die Experimente zeigten, dass die Erhöhung der Expressionsrate des Kältemarkers CBF3 nach Temperaturverringering durch 100 μM 1-NA-PP1 um etwa 60 % reduziert war. Dieser Effekt stellte sich bereits nach einer halbe Stunde Inkubation mit dem Inhibitor und anschließendem 1-stündigen Kältestress ein. Eine Inhibitor-Konzentration von 10 μM erzeugte diesen Effekt nicht mehr. Dennoch genügte diese Konzentration, um die ATP-Bindetaschenvariante aller untersuchten CDPKs *in vitro* vollständig zu inhibieren. Eine Wiederholung der funktionellen Charakterisierung von AtCPK1 könnte mit 10 μM 1-NA-PP1 durchgeführt werden. Dabei könnten die bereits identifizierten Unterschiede im Proteom und Metabolom als Referenz für die *in vivo* Inhibition dienen. Mit der Proteom- und Metabolomanalyse können eine größere Anzahl an Komponenten gleichzeitig untersucht werden als mit RT-PCR an einzelnen Markergenen. So können bei einer Optimierung der Inhibitor-Konzentration basierend auf diesen Analysen auch weitere unspezifische Effekte berücksichtigt werden.

4.2.5 Chemisch-genetische Analyse von AtCPK1 nach Kältestress

Die Expressionsänderung von fünf Markergenen dokumentierte geeignete experimentelle Bedingungen für die Anwendung des Kältestresses. Die Analyse der AtCPK1-Transkriptmengen zeigte außerdem eine vergleichbare Expression von AtCPK1 in den Linien Col-0 und MB2.4.6.1. Auch konnte in beiden Proben eine Erhöhung der Transkription von AtCPK1 nach Kältestress beobachtet werden. Verglichen mit Transkriptionsanalysen von Microarrayexperimenten erfolgte diese Änderung der Transkription relativ früh. Dies könnte in den unterschiedlichen Aufzuchtbedingungen sowie dem Alter der Pflanzen begründet liegen. Die Analyse der fünf Markergene ergab keine AtCPK1-spezifischen Unterschiede zwischen Col-0- und MB2.4.6.1-Pflanzen nach 100 μM Inhibitorgabe. Eine genomweite Transkriptanalyse mittels Microarrays könnte jedoch eine definierte transkriptionelle Regulation von Kälte-induzierten Genen untersuchen. Ähnliche Analysen in *S. cerevisiae* konnten zeigen, dass der chemisch-genetische Ansatz in solchen Analysen genutzt werden kann (Bishop *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2001).

4.2.5.1 Proteomanalyse

In der Proteomanalyse mit Hilfe der 2D-Gele konnte ein Spektrum von ca. 250 Proteinen untersucht werden. Durch zwei unterschiedliche Färbungen der 2D-Gele mit Coomassie Brilliant Blue und ProQ-Diamond konnte sowohl eine differentielle Expression als auch eine differentielle Phosphorylierung von einzelnen Proteinen nach Inhibitorgabe untersucht

werden. Aus der Analyse der Coomassie-gefärbten Gele ergaben sich keine signifikant differentiell exprimierte Proteine. Die chemisch-genetische Methode sollte aber vor allem schnelle Änderungen nach Stressstimulus sichtbar machen.

Die Analyse der ProQ-Diamond-gefärbten 2D-Gele identifizierte bereits einige Signale, die auf eine differentielle Phosphorylierung von Proteinen hinweisen. In fünf Signalen erfolgte in der Mutante nach Inhibitorgabe keine Dephosphorylierung mehr. In einem anderen Fall führte die Inhibitorgabe in der Mutante zu einer geringeren Phosphorylierungsrate eines Proteins. Nach einer Anreicherung der identifizierten Signale wäre der logische folgende Schritt, diese durch eine MALDI-TOF-Analyse zu identifizieren.

Die im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in der Zelle vergleichsweise geringe Zahl an untersuchten Proteinen zeigt, dass nur ein kleiner Teil der zellulären Proteine in dieser Analyse erfasst wurde. Die Coomassie-Färbung detektiert Proteine mit hoher Kopienzahl, die ProQ-Diamond-Färbung Proteine mit hohem Phosphorylierungsgrad und Kopienzahl. Komponenten von Signalkaskaden liegen in der Regel jedoch nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vor und Phosphorylierungsänderungen treten nur transient auf. Durch den Einsatz von 2D-Gelelektrophorese mit kleineren pI-Bereichen und durch Vorfraktionierungen könnten diese Proteine besser aufgelöst und analysiert werden. Für AtCPK1 und AtCPK2 sind Membranlokalisationen beschrieben worden (Lu und Hrabak, 2002; Dammann *et al.*, 2003). In Zukunft könnte die 2D-Gelelektrophorese deshalb durch eine direkte LC-MS/MS Analyse ersetzt werden, da mittels dieser Technik auch Membranproteine in die Untersuchung einbezogen werden können, was in der 2D-Gelelektrophorese schwierig ist (Molloy *et al.*, 1998; Wiener *et al.*, 2004). Die LC-MS/MS Analyse bietet außerdem die Vorteile einer Automatisierung und damit eines hohen Probendurchsatzes. Durch eine Vorselektion auf Phosphopeptide mittels Metallaffinitätschromatographie könnte hier die Probenkomplexität zudem deutlich reduziert werden (Collins *et al.*, 2005; Kange *et al.*, 2005).

4.2.5.2 Metabolomanalyse

Die Metabolomanalyse mittels GC-MS nach Temperaturverringerung zeigte eine Konzentrationsänderung von 14 Metaboliten. Davon wurden 10 Metabolite nach 1-NA-PP1 Behandlung differentiell reguliert.

Es ist beschrieben worden, dass die Konzentration verschiedener Metabolite des primären Kohlenhydratstoffwechsels nach Kältestress induziert wird. Dazu gehören Glukose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat, Glukose, Maltose, Fruktose, Saccharose und Trehalose (Cook *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2004). Die Konzentrationserhöhungen von Trehalose, Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat in den unbehandelten Proben nach Kältestress korreliert

sehr gut mit bereits veröffentlichten Daten, die eine sehr frühe Konzentrationserhöhung dieser Metabolite nach Temperaturverringerung zeigen (Kaplan *et al.*, 2004). Maltose, für das ebenfalls eine sehr frühe Konzentrationserhöhung beschrieben wurde, zeigt keine Induktion unter den verwendeten experimentellen Bedingungen. Nach Inhibition durch 1-NA-PP1 zeigten Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat keine Konzentrationserhöhung mehr. Anstelle dessen konnte eine erhöhte Saccharose-Konzentration nachgewiesen werden. Es ist beschrieben worden, dass es kurze Zeit nach Kältestress zu einer Induktion des Saccharose- und Stärkeabbaus kommt, die im Laufe der Kälteanpassung abnimmt (Klotke *et al.*, 2004). Eine biologische Funktion von CDPKs in der Saccharose-Biosynthese ist bereits für CDPKs gezeigt worden. Die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) ist das Enzym, über das ein Großteil der Saccharose in der Pflanze gebildet wird (Huber und Huber, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass einzelne CDPKs die SPS *in vivo* phosphorylieren und so die Saccharose-Biosynthese regulieren können (McMichael und Huber, 1995; Pagnussat *et al.*, 2002).

Auch Produkte des Citrat-Zyklus, wie 2-Oxoglutarat, Succinat und Fumarat werden nach Kältestress induziert (Cook *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2004). Eine Erhöhung der Konzentration dieser Metabolite war unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht zu beobachten, jedoch kam es nach 1-NA-PP1 Behandlung zu einer Verringerung der Fumarat- und Succinat-Konzentration. Eine Hemmung dieses Abschnitts des Citrat-Zyklus könnte auch der Grund für die differentielle Regulation von Malat und Aspartat nach Inhibitorbehandlung gewesen sein.

Ein weiterer Metabolit, der nach eine Erhöhung der Konzentration nach Kältestress zeigt, ist 4-Aminobutyrat (GABA) (Wallace *et al.*, 1984; Patterson und Graham, 1987). Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen zeigte sich eine Veränderung der Konzentration nur nach Inhibitorgabe. GABA wird in der Pflanze zum Großteil aus Glutamat synthetisiert. Es gibt in Pflanzen aber einen zweiten Syntheseweg, in dem GABA aus Putrescin synthetisiert wird (Flores *et al.*, 1989). Durch Transaminierung kann GABA weiterhin mit Pyruvat zu Alanin umgesetzt werden (Patterson und Graham, 1987). Die Induktion dieses Biosynthesewegs nach Inhibitorbehandlung könnte die differentielle Regulation dieser Metabolite erklären.

Die Ergebnisse der Metabolomanalyse zeigen, dass nach Inhibitorbehandlung in der MB2.4.6.1 Linie Unterschiede auftreten. Im Falle der Saccharose-Biosynthese sind bereits

biologische Funktionen von CDPKs beschreiben worden. Dennoch waren die Veränderungen nach mildem Kältestressstimulus bereits so komplex, dass nur eine biologische Wiederholung und ein Vergleich mit Wildtyppflanzen zeigen kann, ob es sich bei den Unterschieden, um AtCPK1-abhängige Prozesse handelt oder um eine unspezifische Wirkung des Inhibitors in der verwendeten Konzentration.

4.2.6 Ausblick und Anwendungsmöglichkeiten

Die Anwendung kleiner inhibitorischer Moleküle in der Analyse von Proteinkinasen hat bislang deutlich hinter genetischen Methoden zurückgestanden. Genetische Methoden bieten eine einfache Anwendbarkeit bei gleichzeitig hoher Spezifität. Allgemeingültige Methoden sind vorhanden, jegliche Gensequenz in einem Organismus gezielt zu mutieren. Daneben bieten genetische Methoden aber auch eine Reihe von Nachteilen: 1. Genetische Methoden erlauben keine Manipulation der untersuchten Kinasen in Zeiteinheiten, die kleiner sind als die Dauer der untersuchten biologischen Prozesses. Damit ist es nicht möglich die zeitliche Funktion der Kinasen in laufenden Prozessen, wie etwa dem Pollenschlauchwachstum, zu untersuchen. 2. Mutationen und auch Silencing-Methoden sind gar nicht oder nur sehr begrenzt konditional. Die Expression von Silencing-Konstrukten unter induzierbaren Promotoren erlaubt die Erzeugung konditionaler Defizienzen. Dies läuft aber, abhängig von der Umsatzrate der untersuchten Kinase, in Zeiteinheiten von mehreren Stunden bis Tagen ab. Bei temperatursensitiven Mutanten läuft die Inaktivierung deutlich schneller ab, aber neben der Kinaseaktivität verändert sich hier auch die Struktur der untersuchten Kinasen, was Nebeneffekte hervorrufen kann. Und die Temperaturabhängigkeit dieser Methode schränkt ihren Einsatz in der Analyse von Temperaturanpassungen, wie Kältestress, ein. 3. Viele Kinasen zeigen nach Mutation aufgrund redundanter Proteine in der Zelle oder durch eine Anpassung des Organismus keinen veränderten Phänotyp (Ihle, 2000). 4. Essentielle Kinasen können durch Defizienzen nicht untersucht werden, auch hier wäre eine konditionale Methode notwendig (Sieg *et al.*, 1998).

Der Einsatz von Inhibitoren bietet hier Vorteile. Chemische Inhibitionen agieren auf Proteinebene und sind somit schneller als genetische Methoden, oft sogar schneller als die untersuchten Prozesse. Die Hemmung des untersuchten Proteins ist direkt abhängig von der verwendeten InhibitorKonzentration. Die schnelle Wirkung von Inhibitoren könnte zudem Anpassungsmechanismen zuvorkommen, und so eine Analyse von Phänotypen redundanter Proteine erlauben. Vor allem Proteine, die in Komplexen assoziiert sind, liegen auch als ATP-

Bindetaschenvariante darin vor und verlieren nach Inhibierung ausschließlich ihre Aktivität. Essentielle Proteine können damit ebenfalls untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die chemisch-genetische Methode zur Charakterisierung von pflanzlichen Kinasen mit unbekannter Funktion *in vivo* eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der Testversuche werden nach der Optimierung der verwendeten Methoden überprüft und die chemisch-genetische Methode auf mehr CDPK-Isoformen ausgeweitet werden. Auch eine Ausweitung der verabreichten Stressstimuli auf weitere abiotische Stresse und Pathogentests ist in Vorbereitung.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass in den reversen chemisch-genetischen Versuchen in einem isogenetischen Hintergrund gearbeitet wird. Die Inaktivierung der Kinase erfolgt konditional mit Hilfe des pharmazeutischen Inhibitors 1-NA-PP1. Dabei können Phänotypen nach Inhibitorbehandlung immer mit Kontrolllinien ohne Inhibitor verglichen werden. T-DNA Insertions-Linien von AtCPK2 sind im Rahmen dieser Arbeit mit ATP-Bindetaschenvarianten komplementiert worden und liegen jetzt homozygot für weitere Untersuchungen bereit. Diese Linien können nun mit und ohne Inhibitorbehandlung auf eine Veränderung des Spitzenwachstums in Pollenschläuchen, Wurzelhaaren und Trichomen untersucht werden. Mit dieser Methode könnte vielleicht auch ein stärkerer Phänotyp erzeugt werden, da die geringe Reduktion immer noch auf eine Anpassung der Pollenkörner oder eine redundante CDPK-Aktivität zurückzuführen sein könnte. Diese Anwendung zeigt, dass nicht nur Veränderungen nach Stressstimuli durch die chemisch-genetische Methode analysiert werden können, sondern auch schnelle entwicklungsbezogene Prozesse, wie das Pollenschlauch- und Wurzelhaarwachstum. Gerade für die Wurzelhaarentwicklung ist es notwendig, im ganzen Organismus zu arbeiten, da die Entwicklung von Wurzelhaaren in Zellkulturen nicht simuliert werden kann.

Insgesamt bietet die chemisch-genetische Methode eine Ergänzung zu klassischen Methoden, erlaubt aber durch die molekularen Phänotypen eine schnelle Einordnung der untersuchten Kinasen in Signal- und Synthesewege. Die Anwendung dieser Methode könnte in Zukunft auch auf weitere Kinasefamilien und andere Nukleotid-bindende Proteine, wie Myosine und GTPasen ausgeweitet werden.

4.3 Phosphoregulation von CDPKs

Nachdem die biochemische Aktivierung von CDPKs nach Kalziumbindung *in vivo* demonstriert werden konnte (Freymark, 2005), ist eine der vorrangigsten Fragestellungen nun die Rolle der Phosphorylierungen in der Regulation der Kinaseaktivität.

In der N-terminalen Domäne von NtCDPK2 sind zwei Phosphorylierungsstellen identifiziert worden, die nach abiotischem und biotischem Stressestimulus phosphoryliert werden. Thr65 wird dabei von NtCDPK2 autophosphoryliert, Ser40 wird durch eine noch unbekannte Kinase phosphoryliert (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht). Die Phosphorylierungen nach Stressestimulus sind mit einer Erhöhung der Kinaseaktivität in Verbindung gebracht worden (Romeis *et al.*, 2001). Beide Phosphorylierungen führen zu Mobilitätsverschiebungen in der SDS-Gelelektrophorese, was auf eine Konformationsänderung des N-Terminus hindeutet. Auch AtCPK2 zeigt eine Mobilitätsverschiebung nach hypo-osmotischem Stress. Es konnte auch in diesem Falle ein phosphoryliertes Peptid im N-Terminus identifiziert werden, das vermutlich für die Mobilitätsverschiebung verantwortlich ist (C.-P. Witte, N. Zappel und T. Romeis, unveröffentlicht).

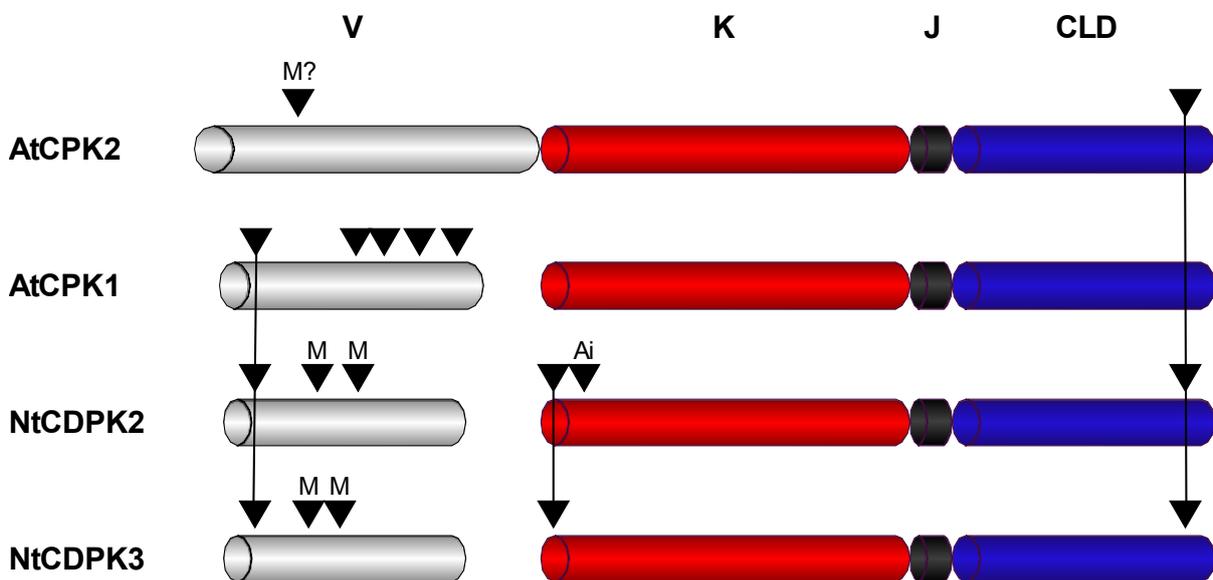


Abbildung 4-4 Übersicht über die Phosphorylierungsstellen in den orthologen Isoformen AtCPK1, AtCPK2, NtCDPK2 und NtCDPK3. Dargestellt sind Domänenstrukturen (V: variable Domäne, K: Kinase-Domäne, J: Junction-Domäne, CLD: Calmodulin-ähnliche Domäne) und Phosphorylierungsstellen von NtCDPK2 und NtCDPK3 (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht), AtCPK1 (Hegeman *et al.*, 2004) und AtCPK2 (C.-P. Witte, N. Zappel und T. Romeis, unveröffentlicht; diese Arbeit). Homologe Aminosäure-Positionen sind durch verbindende Striche markiert. Phosphorylierungen, die zu einer Mobilitätsverschiebung in

der SDS-Gelelektrophorese führen (M) oder für die eine autoinhibitorische Rolle (Ai) diskutiert werden kann, sind entsprechend markiert.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des Nanospray-Tandem-MS in AtCPK2 nach heterologer Expression in *N. benthamiana* eine weitere Phosphorylierungsstelle, Ser641, identifiziert werden (Abbildung 4-4). Diese Phosphorylierungsstelle liegt im C-Terminus und ist ebenfalls für NtCDPK2 und NtCDPK3 beschrieben worden (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht). Die Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von NtCDPK2 und NtCDPK3 befinden sich in einem Bereich in dem mehrere Serine liegen (Abbildung 4-5). Untersuchungen an NtCDPK2 zeigten Phosphorylierungen sowohl am ersten als auch am zweiten Serin. Für NtCDPK3 ist, genau wie für AtCPK2, nur eine Phosphorylierung am zweiten Serin bestimmt worden.

AtCPK2	(635)	MGLENSI S ISLK	Abbildung 4-5 Vergleich der Phosphorylierungsstellen am C-Terminus von AtCPK1, AtCPK2 NtCDPK2 und NtCDPK3. Markiert sind die phosphorylierten Serine in den tryptischen Peptiden.
AtCPK1	(603)	SFSIALK	
NtCDPK2	(566)	GLEH SF STGFR	
NtCDPK3	(563)	GLEHS F SIGFR	

In NtCDPK2 und NtCDPK3 handelt es sich dabei vermutlich um eine konstitutive Phosphorylierung (C.-P. Witte und T. Romeis, unveröffentlicht), während in dieser Arbeit für AtCPK2 eine Stimulusabhängigkeit der Ser641 Phosphorylierung gezeigt werden konnte. Für AtCPK1 ist diese Phosphorylierung bisher nicht beschrieben worden. Allerdings ist AtCPK1 bisher auch nur nach Expression in *E. coli* und anschließender *in vitro* Autophosphorylierung untersucht worden (Hegeman *et al.*, 2004). Die Stimulusabhängigkeit dieser Phosphorylierung könnte funktionelle Ursachen haben und beispielsweise an der Erhöhung der Kinaseaktivität nach Stressstimulus beteiligt sein.

Mittels Nanospray-MS konnten bislang nur etwa 60 % der gesamten Proteinsequenz von AtCPK2 auf Phosphorylierungsstellen hin untersucht werden. Eine Reihe von Techniken, wie verschiedene IMAC-Techniken, stehen inzwischen zur Verfügung, um phosphorylierte Peptide anzureichern (Martin *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Kange *et al.*, 2005). Darüber hinaus wird an Möglichkeiten gearbeitet, ungespaltenes Gesamtprotein zu analysieren, um die Anzahl an Phosphorylierungen in einem Protein zu bestimmen (T. Colby, persönliche Mitteilung). Mittels dieser Techniken könnten erstmals Aussagen darüber gemacht werden, wie viele der vorhandenen Phosphorylierungsstellen eines Proteins identifiziert worden sind.

4.3.1 Autoinhibition

Es wurde in dieser Arbeit eine weitere Phosphorylierung an Thr131 in NtCDPK2 funktionell charakterisiert, die nach Expression des Enzyms in *E. coli* identifiziert worden war (C.-P. Witte, J. Gielbert und T. Romeis, unveröffentlicht). Thr131 liegt an einer der vier konservierten Positionen in den β -Faltblättern (Abbildung 4-3) und befindet sich bei allen bislang gefundenen CDPKs an dieser Position. CDPKs unterscheiden sich damit deutlich von anderen Kinasen, die an dieser Position vornehmlich ein Valin besitzen. Massenspektrometrische Daten von autophosphorylierten und nicht-autophosphorylierten Fraktionen von NtCDPK2 zeigten ein umgekehrtes Verhältnis zwischen der Thr131- und der Thr65-Phosphorylierung. Dies lässt vermuten, dass die Thr131-Phosphorylierung einen Einfluss auf die Autophosphorylierung von NtCDPK2 haben könnte. NtCDPK2, welches in transgenem CF-9-Tabak exprimiert wurde, zeigte eine konzentrationsabhängige Konformationsänderung nach Elizitierung mit Avr9. Diese Konformationsänderung korrelierte, wie mit in-Gel Kinasetests gezeigt werden konnte, mit einer Aktivierung der Kinase (Romeis *et al.*, 2000). Daraus lässt sich die Hypothese formulieren, dass über das Verhältnis von aktivierter zu nicht-aktivierter Kinase die Stärke der Signalweiterleitung moduliert werden kann. Dies geschieht vermutlich nicht über eine Modulation der Kalziumkonzentration, da auch unter *in vitro* Bedingungen bei hohen Kalziumkonzentrationen NtCDPK2 keine vollständige Aktivierung zeigte.

Die Aminosäureposition von Thr131 befindet sich räumlich sehr nah an zwei inhibierenden Phosphorylierungsstellen, die aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) bekannt sind (Abbildung 4-6). In CDKs können ein Tyrosin (Tyr15) und ein Threonin (Thr14) durch fremde Kinasen phosphoryliert werden, wodurch die Kinaseaktivität inhibiert wird (zusammengefasst in Morgan, 1995). In NtCDPK2 handelt es sich bei der Thr131-Phosphorylierung hingegen vermutlich um eine Autophosphorylierung, da in *E. coli* keine Serin/Threonin-Kinasen vorliegen.

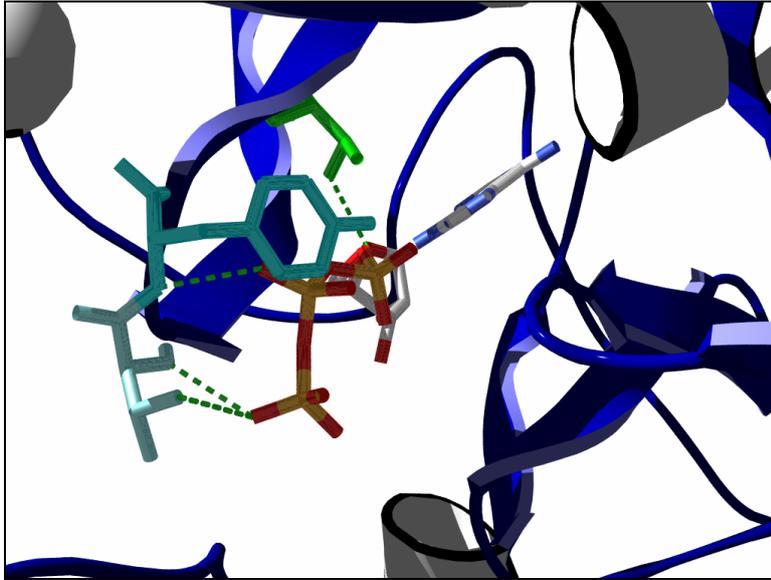


Abbildung 4-6 Modell der ATP-Bindetasche von CDC2 und NtCDPK2. Gezeigt sind die Aminosäuren Thr14 und Tyr15, die in CDC2 nach Phosphorylierung zu einer Inhibition der Kinaseaktivität führen (blau) und Thr131 (grün) aus NtCDPK2.

Mutationsexperimente in NtCDPK2, in denen Thr131 nach Alanin, Valin und Aspartat ausgetauscht wurden, zeigten, dass ein Austausch zu Aspartat die Kinaseaktivität vollständig inhibierte, während nach den Austauschen zu Alanin und Valin die Kinaseaktivität nur leicht reduziert war. Auch im Mobilitätsverhalten der Varianten in der SDS-Gelelektrophorese konnten Unterschiede beobachtet werden. Die Wildtypform lag zu etwa zwei Dritteln in der autophosphorylierten Form vor. NtCDPK2^{T131D} zeigte dagegen fast keine Autophosphorylierung. NtCDPK2^{T131V} war annähernd vollständig an Thr65 autophosphoryliert. Darüber hinaus zeigte NtCDPK2^{T131V} weitere Mobilitätsformen, die auf eine deregulierte Phosphorylierung hindeuten.

Das Vorhandensein eines Threonins an dieser Aminosäureposition in allen CDPKs könnte ein Indiz für einen allgemeinen regulatorischen Mechanismus sein. Dies unterstützen auch die Kinasetests nach Aminosäureaustausch der analogen Aminosäureposition in AtCPK2. Durch eine Phosphorylierung der zu Thr131 analogen Aminosäurepositionen könnten unerwünschte Autophosphorylierungen der CDPKs verhindert werden, oder die Kinaseaktivität der Stärke des Stressstimulus angepasst werden, wie die vorherigen Untersuchungen mit Avr9 und NtCDPK2 nahe legen (Romeis *et al.*, 2000). In diesem Fall müsste es, da es sich bei dieser Phosphorylierung um eine Autophosphorylierung handelt, weitere Co-Faktoren geben, welche die Thr131 Phosphorylierung beeinflussen. Auch ein Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Phosphorylierungen nach unterschiedlichen Stressstimuli wäre vorstellbar. Zukünftige Untersuchungen zum biochemischen Aktivierungsmechanismus von NtCDPK2 *in vivo* müssten daher der Frage nachgehen, in welcher Reihenfolge es zu den

Phosphorylierungen in NtCDPK2 kommt, ob Co-Faktoren identifiziert werden können, welche Rolle eine „upstream“-Kinase hat und wie die Phosphorylierungen mit der Bindung und Aktivierung durch Kalzium korrelieren.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* verwendet. *Nicotiana benthamiana* diente durch die Möglichkeit der transienten Expression zur Herstellung größerer Proteinmengen für die Suche nach Phosphorylierungsstellen und zur biochemischen Charakterisierung der CDPKs. *Arabidopsis thaliana* wurde aufgrund des vollständig sequenzierten Genoms für alle genetischen Analysen eingesetzt, vor allem für die chemisch-genetischen Versuche.

5.1.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Für diese Arbeit wurden eine Wildtyplinie (Ökotyp Col-0) und transgene Linien von *Arabidopsis thaliana* verwendet, die im Nachfolgenden näher charakterisiert sind. Als Wildtyp-Kontrolle diente in allen Versuchen die Linie Col-0. Die T-DNA Insertionslinien dienten als Hintergrund für die Komplementation mit ATP-Bindetaschenvarianten.

Ökotyp	Abkürzung	Originalquelle
Columbia	Col-0	J. Dangl ^a

^aUniversity of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

Gen	Hintergrund	Linie	Mutagen	Referenz/Quelle
<i>cpk1-1</i>	Col-0	GABI 304D05	T-DNA	(Rosso <i>et al.</i> , 2003)
<i>cpk1-2</i>	Col-0	SALK 096452	T-DNA	(Alonso <i>et al.</i> , 2003)
<i>cpk2-1</i>	Col-0	SALK 059237	T-DNA	(Alonso <i>et al.</i> , 2003)

Folgende *Arabidopsis* Linien wurden in dieser Arbeit erstellt und für die gewebespezifische Expression und die chemisch-genetischen Versuche analysiert.

Konstrukt	Hintergrund	Resistenz
pXC1 GUS	Col-0	Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT)
pXC2 GUS	Col-0	Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT)
pXC1 AtCPK1 ^{M228A}	<i>cpk1-2</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT)
pXC2 AtCPK2 ^{M264A}	<i>cpk2-1</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT)

5.1.1.2 *Nicotiana benthamiana*

Samen der *N. benthamiana* Pflanzen stammen von Tina Romeis, FU Berlin.

5.1.2 Bakterienstämme

Es wurden in dieser Arbeit zwei Bakterienarten verwendet: *Escherichia coli* für alle molekularbiologischen Methoden und zur Proteinexpression und *Agrobacterium tumefaciens* für die Pflanzentransformation.

5.1.2.1 *Escherichia coli*

Der Stamm MachTM1 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde für alle molekularbiologischen Techniken verwendet, abgesehen von der Kultivierung von Gateway[®]- Expressionsvektoren ohne Insert. Dafür wurde der Stamm DB3.1TM (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Stamm BL21(DE3)pLysS diente der Proteinexpression in *E. coli* aus dem Vektor pET30CTH.

Stamm	Genotyp
Mach TM 1	F ⁺ φ80(lacZ)ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(rk ⁻ , mk ⁺) ΔrecA1398 endA1 tonA
DB3.1 TM	F ⁻ gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB ⁻ , mB ⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmrR) xyl5 λ ⁻ leu mtl1
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdS B(rB ⁻ mB ⁻)gal dcm (DE3) pLysS (Cam R)

5.1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

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

5.1.3 Vektoren

5.1.3.1 Ausgangsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung
pCR [®] -Blunt II- TOPO [®]	Topo [®] -Vektor, erlaubt das Klonieren von PCR-Produkten ohne A-Überhang mittels Topoisomerase; bezogen von Invitrogen, Karlsruhe.
pENTR [™] /D-TOPO [®] AtCPK1	TOPO [®] -Vektor, trägt cDNA von <i>AtCPK1</i> ; hergestellt von A.-C. Cazalé.
pENTR [™] /D-TOPO [®] AtCPK2	TOPO [®] -Vektor, trägt cDNA von <i>AtCPK2</i> ; hergestellt von G. Freymark, MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg.
pXCSG-StrepII	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor für die Expression von Fusionsproteinen unter Kontrolle des Blumenkohl Mosaik Virus (CMV)-Promotors 35S. Das Fusionsprotein trägt einen C-terminalen StrepII-Epitop-tag. (Witte <i>et al.</i> , 2004).
pXCSG-StrepII AtCPK1	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor mit StrepII-markiertem <i>AtCPK1</i> -Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors; hergestellt von A.-C. Cazalé.
pXCSG-StrepII AtCPK2	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor mit StrepII-markiertem <i>AtCPK2</i> -Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors; hergestellt von G. Freymark, MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
pXCA-HAStrepII	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor für die Expression von Fusionsproteinen unter Kontrolle des Promotors <i>alcA</i> , das Fusionsprotein trägt dabei einen C-terminalen Hämagglutinin (HA)- und einen StrepII-Epitop-tag; hergestellt von C.-P. Witte, FU Berlin
pXCS-HAStrepII NtCDPK2VK	Binärer Gateway [®] -Expressionsvektor mit HA und StrepII-markiertem <i>NtCDPK2VK</i> -Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors; hergestellt von C.-P. Witte, FU Berlin

pET32bGW	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor für Klonierungen mittels Gateway [®] -Technologie; bezogen von B. Ülker, MPIZ, Köln
pET30CTH NtCDPK2	Modifizierter pET30 Vektor (Novagen, Darmstadt), der einen C-terminalen 6xHis-Epitop-tag und eine reduzierte multiple Klonierungsstelle besitzt; hergestellt von C.-P. Witte, FU, Berlin
pET30CTH NtCDPK2 ^{T131V}	Modifizierter pET30 NtCDPK2 Vektor, in dem Thr131 zu Valin mutiert wurde; hergestellt von C.-P. Witte, FU Berlin
pET30CTH NtCDPK2 ^{T131D}	Modifizierter pET30 NtCDPK2 Vektor, in dem Thr131 zu Aspartat mutiert wurde; hergestellt von C.-P. Witte, FU, Berlin
pXC1 GUS	Binärer Expressionsvektor, der das <i>E. coli uidA</i> -Gen (GUS) unter Kontrolle des AtCPK1-Promotors aus pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK1g trägt; hergestellt von K. Saito, MPIZ, Köln
pXC2 GUS	Binärer Expressionsvektor, der das <i>E. coli uidA</i> -Gen (GUS) unter Kontrolle des AtCPK1-Promotors aus pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK2g trägt; hergestellt von K. Saito, MPIZ, Köln

5.1.3.2 In dieser Arbeit hergestellte Vektoren

Vektor	Kurzbeschreibung
Vektoren zur Generierung Inhibitor-sensitive <i>A. thaliana</i> Linien	
pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] AtCPK1g	Der Vektor trägt das PCR-Produkt an genomischer <i>A. thaliana</i> DNA mit den Primern TR361 und TR369. Dies umfasst die kodierende Sequenz von <i>AtCPK1</i> mit der nativen Promotorregion.
pET32bGW AtCPK2 ^{M264A}	Gateway [®] -Klonierung aus pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK2 ^{M264A} in pET32bGW.

pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK1g ^{M228A}	Das <i>Eco</i> NI/ <i>B</i> lpI-Fragment, das die M228A Mutation trägt, wurde aus pET32bGW AtCPK2 ^{M228A} in den mit <i>Eco</i> NI/ <i>B</i> lpI-geschnittenen Vektor pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK1g kloniert.
pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK2g	Vektor trägt das PCR-Produkt an genomischer <i>A. thaliana</i> DNA mit den Primern TR362 und TR368, die Primer flankieren die kodierende Sequenz von <i>AtCPK2</i> mit der nativen Promotorregion.
pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK2g ^{M264A}	Das <i>B</i> lpI-Fragment, das die M228 Mutation trägt, wurde aus pXCSG-Strep AtCPK2 ^{M264A} in den mit <i>B</i> lpI-geschnittenen Vektor pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK2g kloniert.
pXC1-HAStrepII AtCPK1g ^{M228A}	Das <i>Asc</i> I/ <i>X</i> maI-Fragment aus pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK1g ^{M228A} , welches den genomischen Bereich von <i>AtCPK1</i> ^{M228A} trägt, wurde in den mit <i>Asc</i> I/ <i>X</i> maI-geschnittenen Vektor pXCA-HA-StrepII kloniert.
pXC2-HAStrepII AtCPK2g ^{M264A}	Das <i>Asc</i> I/ <i>X</i> maI-Fragment aus pCR [®] -Blunt II- TOPO [®] AtCPK2g ^{M264A} , welches den genomischen Bereich von <i>AtCPK2</i> ^{M264A} trägt, wurde in den mit <i>Asc</i> I/ <i>X</i> maI-geschnittenen Vektor pXCA-HA-StrepII kloniert.
Biochemische Charakterisierung	
pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK1 ^{M228A}	Mutagenese von pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK1 mit den Primern TR221 und TR222.
pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK1 ^{M228G}	Mutagenese von pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK1 mit den Primern mit TR219 und TR220.
pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK2 ^{M264A}	Mutagenese von pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK2 mit den Primern mit TR225 und TR226.
pXCSG-Strep AtCPK1 ^{M228A}	Hergestellt durch Gateway [®] -Klonierung aus pENTR TM /D-TOPO [®] AtCPK1 ^{M228A} in pXCSG-StrepII.

pXCSG-Strep AtCPK1 ^{M228G}	Hergestellt durch Gateway [®] -Klonierung aus pENTR [™] /D-TOPO [®] AtCPK1 ^{M228G} in pXCSG-StrepII.
pXCSG-Strep AtCPK2 ^{M264A}	Hergestellt durch Gateway [®] -Klonierung aus pENTR [™] /D-TOPO [®] AtCPK2 ^{M264A} in pXCSG-StrepII.
pXCS-HASStrepII NtCDPK2VK ^{M195A}	Mutagenese von pXCS-HASStrepII NtCDPK2VK mit den Primern TR215 und TR216.
pXCS-HASStrepII NtCDPK2VK ^{M195G}	Mutagenese von pXCS-HASStrepII NtCDPK2VK mit den Primern TR217 und TR218.
pET30CTH NtCDPK2 ^{M195A}	Das <i>NcoI/AgeI</i> -Fragment, welches die M195A-Mutation trägt, wurde aus pXCS-HASStrepII NtCDPK2VK ^{M195A} in den mit <i>NcoI/AgeI</i> -geschnittenen Vektor pET30CTH NtCDPK2 kloniert.
pET30CTH NtCDPK2 ^{M195G}	Das <i>NcoI/AgeI</i> -Fragment, welches die M195G-Mutation trägt, wurde aus pXCS-HASStrepII NtCDPK2VK ^{M195G} in den mit <i>NcoI/AgeI</i> -geschnittenen Vektor pET30CTH NtCDPK2 kloniert.
Phosphoregulation	
pET30CTH NtCDPK2 ^{M131A}	Mutagenese von pET30CTH NtCDPK2 mit den Primern TR489 und TR490.
pXCSG-Strep AtCPK2 ^{T200A}	Mutagenese von pXCSG-Strep AtCPK1 mit den Primern TR491 und TR492.
pXCSG-Strep AtCPK2 ^{T200D}	Mutagenese von pXCSG-Strep AtCPK1 mit den Primern TR495 und TR496.
pXCSG-Strep AtCPK2 ^{T200V}	Mutagenese von pXCSG-Strep AtCPK1 mit den Primern TR493 und TR494.

5.1.3.2.1 Vektoren zur Erzeugung Inhibitor-sensitiver *A. thaliana* Linien

Für die Herstellung der Vektoren für die Inhibitor-sensitiven *A. thaliana* Linien wurde ein genomisches DNA-Fragment aus der jeweiligen CDPK mit allen Introns und dem 5'

regulatorischen Bereich bis zum oberhalb gelegenen Gen mittels PCR aus dem Genom amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde nach Angaben des Herstellers in pCR[®]-BluntII-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Der rekombinante Vektor wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die ATP-Bindetaschenmutationen wurden durch klassische Klonierungen eingefügt. Im Falle von pCR[®]-BluntII-TOPO[®] AtCPK2^{M264A} wurde pXCSG AtCPK2^{M264A} mit dem Restriktionsenzym *BspI* geschnitten und das Fragment, welches die Mutation trug, durch Ligation in den mit *BspI*-geschnittenen Vektor pCR[®]-BluntII-TOPO[®] AtCPK2 eingebracht. Im Falle von pCR[®]-BluntII-TOPO[®] AtCPK1^{M228A} und pCR[®]-BluntII-TOPO[®] AtCPK1^{M228G} wurden pET32bGW AtCPK1^{M228A} bzw. pET32bGW AtCPK1^{M228G} mit den Restriktionsenzymen *BspI* und *EcoNI* geschnitten und das jeweilige Fragment, welches die Mutation trug, in den mit *BspI*/*MluI*-geschnittenen Vektor pCR[®]-BluntII-TOPO[®] AtCPK1 ligiert. Die Expressionsvektoren wurden durch Ausschneiden der CDPKs aus den pCR[®]-Vektoren mittels *AscI* und *XmaI* und durch Ligation in den *AscI*/*XmaI*-geschnittenen Vektor pXCS-HAStrepII generiert.

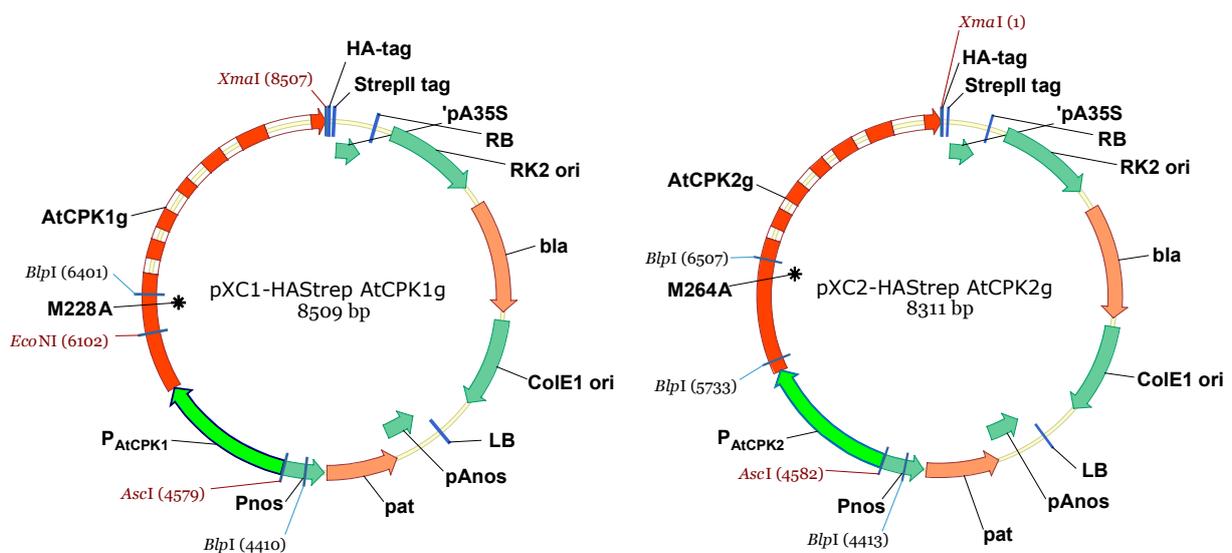


Abbildung 5-1 Übersichtskarten der Vektoren pXC1-HAStrepII AtCPK1 und pXC2-HAStrepII AtCPK2. Gezeigt sind die nativen Promotorregionen (grün), die Gene mit Introns (orange), die Vektorbereiche (blassgrün, blassorange), sowie Restriktionsschnittstellen, Mutationsstellen und Epitop-tags.

5.1.3.2.2 Vektoren zur biochemischen Charakterisierung

Für die biochemische Charakterisierung der zwei *A. thaliana* CDPKs wurden Gateway[®]-kompatible Expressionsvektoren verwendet. Die Ausgangsklone, die bereits vorlagen, wurden zuvor mittels Mutagenese-PCR modifiziert. Dabei wurde ein Protokoll basierend auf dem QuickChange[®] Protokoll von Stratagene (Heidelberg) angewandt (s. 0). Die mutierten CDPKs

wurden anschließend mittels Gateway[®]-Klonierung nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) in den Expressionsvektor pXCSG-StrepII kloniert.

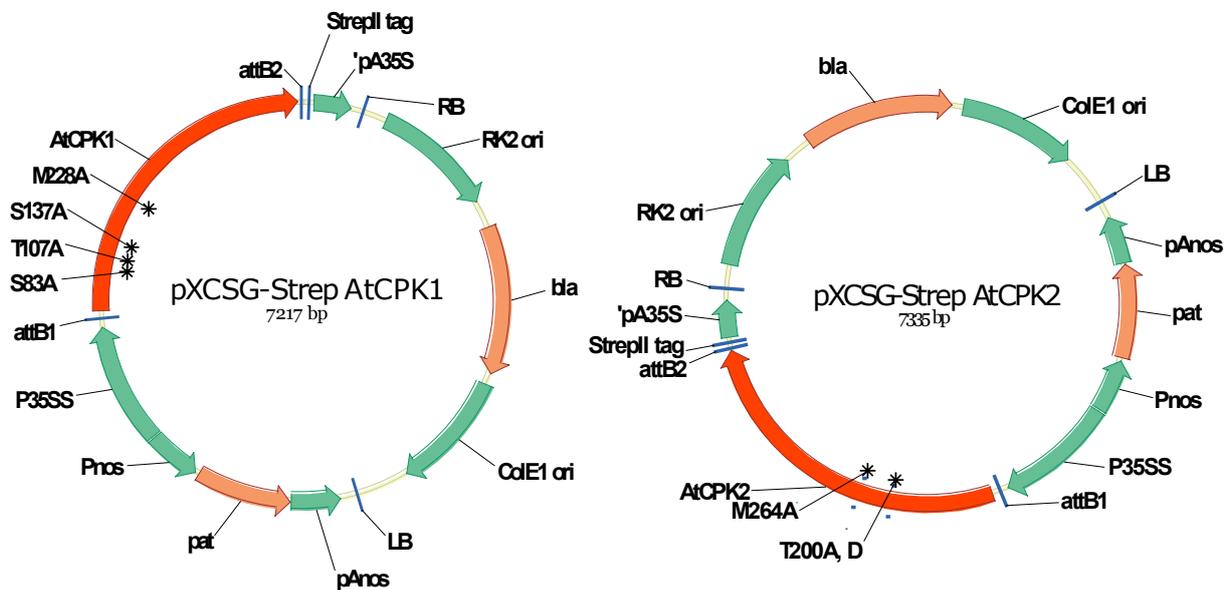


Abbildung 5-2 Übersichtskarten der Vektoren pXCSG-StrepII AtCPK1 und pXCSG-StrepII AtCPK2. Gezeigt sind die cDNAs (orange), die Vektorbereiche (blassgrün, blassorange), sowie Mutationsstellen und Epitop-tags.

5.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden synthetisiert von den Firmen: MWG Biotech bzw. Operon. Die Nukleotidsequenz ist jeweils in 5'-3'-Richtung angegeben.

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
Primer zu Klonierung genomischer CDPKs		
TR361	ggcgcgccatgatgtttagaacaccaa	AtCPK1g 3'-Primer
TR369	cccggggagttaagagcaatgctaa	AtCPK1g 5'-Primer
TR362	ggcgcgccttatcgcggatcatacat	AtCPK2g 5'-Primer
TR368	cccgggatgttcagagaaatgctaa	AtCPK2g 3'-Primer
Primer zur Mutagenese		
TR215	gttcatgctgtgcggaatattgtgctgg	NtCDPK2 M195A 5'-Primer
TR216	ccagcacaatattccgaacgacatgaac	NtCDPK2 M195A 3'-Primer
TR217	gttcatgctgtggggaatattgtgctgg	NtCDPK2 M195G 5'-Primer
TR218	ccagcacaatattcccaacgacatgaac	NtCDPK2 M195G 3'-Primer

TR221	cctttagcggagtggtgtgcaggcg	AtCPK1 M228A 5'-Primer
TR222	cgctgcacaacactccgctacaagg	AtCPK1 M228A 3'-Primer
TR225	catcttgtcgggagttgtgtcgggtg	AtCPK2 M264A 5'-Primer
TR226	cacccgaacacaactccgccacaagatg	AtCPK2 M264A 3'-Primer
TR489	cgacacatttaacgcagttccgaattgtcc	NtCDPK2 T131A 3'-Primer
TR490	ggacaattcggaactcgtttaaatgtgtcg	NtCDPK2 T131A 3'-Primer
TR491	gggacggcgttttatgcctcgagaaagg	AtCPK2 T200D 5'-Primer
TR492	cctttctcgaggcataaaaacgccgtccc	AtCPK2 T200D 3'-Primer
TR493	gggacgggtgttttatgcctcgagaaagg	AtCPK2 T200V 5'-Primer
TR494	cctttctcgaggcataaaaacaccgtccc	AtCPK2 T200V 3'-Primer
TR495	gggacggacttttatgcctcgagaaagg	AtCPK2 T200A 5'-Primer
TR496	cctttctcgaggcataaaaactgcgtccc	AtCPK2 T200A 3'-Primer

RT-PCR-Primer

TR104	atcttctgagcttgttca	AtCPK1 3'-Primer
TR317	attgtcttgatcaacatcgcgc	AtCPK1 5'-Primer
TR475	aaatttctctcaattctctetacc	Ubiquitin 5'-Primer
TR476	ccacggagcctgaggaccaagtgg	Ubiquitin 3'-Primer
TR617	tctgaaatgtttggtcgcg	CBF2 5'-Primer
TR619	atggcgctcgaggctcttac	STZ 5'-Primer
TR620	ggttgcgatatcggagatca	ZAT12 5'-Primer
TR622	tctgcttttctgaaatgtttggc	CBF3 5'-Primer
TR623	tgcaacagagaagaagcaag	ACS6 5'-Primer
TR626	cttcatccatataaaaacgc	CBF2 3'-Primer
TR628	tccttcgtagtggcaccgc	STZ 3'-Primer
TR629	caaattgtccaccatcceta	ZAT12 3'-Primer
TR631	aacgcatttctgctctgttc	CBF3 3'-Primer
TR632	aggggttggactaagaaac	ACS6 3'-Primer
TR674	gtgaacgattcctggacctgcctc	Aktin 5'-Primer
TR675	gagaggttacatgttcaccacaac	Aktin 3'-Primer

5.1.5 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt a. M.; Amersham Biosciences, Braunschweig), RNase A (Roche, Mannheim), Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Biosciences, Braunschweig), Rinderserumalbumin (New England Biolabs, Frankfurt a. M.), PfuTurbo[®] DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg), T4 DNA Ligase (Roche, Braunschweig), Superscript[™]III RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen[™], Karlsruhe), LR-Clonase (Invitrogen, Karlsruhe).

5.1.6 Chemikalien

Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, vom Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.a.) und wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Invitrogen[™] (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und GIBCO[™] BRL[®] (Neu Isenburg) bezogen.

5.1.7 Nährmedien

Medium	Zusammensetzung /L
Luria Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7.0 Für Festmedium wurde 1,5 % (w/v) Agar zugegeben
CR-Medium	20 g Difco Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g MgSO ₄ 10 mM KCl pH 7.6
YEB-Medium	5 g Fleischextrakt 1 g Hefeextrakt 5 g Proteose-Pepton No. 3 5 g Saccharose 2 mL MgSO ₄ (1 M) pH 7.2 Für Festmedium wurde 1,5 % (w/v) Agar zugegeben

Murashige und Skoog-Medium	4,8 g	Murashige und Skoog Medium mit MES-Puffer und Vitaminen (Duchefa)
	10 g	Saccharose
Für Festmedium wurde 0,9 % (w/v) Pflanzenagar (Duchefa, NL) zugegeben		
Für die Selektion auf Phosphinothricin-Resistenz wurde dem Festmedium 10 mg/L DL-Phosphinothricin zugegeben.		

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Flüssigmedium und -Festmedium verwendet. Für die Kultivierung von *A. tumefaciens* wurde YEB-Festmedium und -Flüssigmedium verwendet. Die Nährmedien wurden durch 20 Minuten Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Vor der Zugabe von Antibiotika wurden die Medien auf 55 °C abgekühlt. Antibiotika wurden, soweit nicht anders beschrieben, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (Amp) 100 µg/ml, Carbenicillin (Carb) 50 µg/ml, Gentamycin (Gent) 15 µg/ml, Kanamycin (Kan) 50 µg/ml, Rifampicin (Rif) 100 µg/ml, Tetracyclin (Tet) 12,5 µg/ml. Hitzelabile Komponenten wurden nicht autoklaviert, sondern vor der Zugabe sterilfiltriert. Kultivierung von *A. thaliana* auf Festmedium und in hydroponischen Schüttelkulturen erfolgte in MS-Medium (Duchefa, NL).

5.1.8 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden in dieser Arbeit verwendet:

Puffer / Lösung	Inhalt	
Agromix	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/KOH, pH5.6
	150 µM in H ₂ O	Acetosyringon
DEPC-H ₂ O	0,1 % (w/v) in H ₂ O	Diethylpyrokarbonat
Dichter SDS-Puffer	0,1 M	Tris/HCl, pH 8.0
	30 % (w/v)	Saccharose
	2 % (w/v)	SDS
	0,5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
DNA Ladepuffer (6x)	40 % (w/v)	Saccharose
	0,1 M	EDTA
	0,25 % (w/v)	Orange G
	in H ₂ O	

Ethidiumbromid-Lösung	1 % (w/v) in H ₂ O verdünnt 1:40000 in Agaroselösung	Ethidiumbromid
Ex Strep Puffer	100 mM 5 mM 5 mM 150 mM 10 mM 0,2 mM 2 µg/mL 0,5 % (v/v) 0,5 % 50 mM 5 mM 10 mM 10 % (w/v) in H ₂ O	Tris/HCl, pH 8.0 EDTA EGTA NaCl DTT AEBSF Antipain/Leupeptin Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Deisenhofen) Triton X-100 β-Glycerolphosphat Na ₃ VO ₄ NaF Avidin
FDA-Färbelösung	0,02 % (w/v) 10 % (v/v) 0,5 M in H ₂ O	Fluorescein Diacetat Aceton Saccharose
GUS-Färbelösung	0,1 M 0,5 mM 0,5 mM 10 mM 0,1 % (v/v) in H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7.0 K ₃ Fe(CN) ₆ K ₄ Fe(CN) ₆ EDTA Triton X-100
	Vor Gebrauch wurden 10 % (v/v) Methanol und 0,05 % (w/v) X-Gluc hinzugefügt.	
Pollenwachstumsmedium (Stadler <i>et al.</i> , 1999)	0-10 mM 0,4 mM 0,5 % (w/v) 10 % (w/v) in H ₂ O pH 7, mit Tris eingestellt	CaCl ₂ ·H ₂ O Borsäure Pflanzenagar Saccharose

Proteinextraktionspuffer für Pflanzen	100 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	5 mM	EDTA
	5 mM	EGTA
	150 mM	NaCl
	10 mM	DTT
	0,2 mM	AEBSF
	2 µg/mL	Antipain/Leupeptin
	0,5 % (v/v)	Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Deisenhofen)
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
	50 mM	β-Glycerolphosphat
	5 mM	Na ₃ VO ₄
	10 mM	NaF
	in H ₂ O	
SDS Probenpuffer (6x)	300 mM	Tris/HCl, pH 6.8
	20 % (w/v)	SDS
	30 % (w/v)	Glyzerin
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	600 mM	DTT
	in H ₂ O	
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	125 mM	Tris
	200 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	in H ₂ O	
Strep-Elutionspuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	2 mM	DTT
	150 mM	NaCl
	10 mM	Desthiobiotin
	0,05 % (v/v)	Triton X-100
	in H ₂ O	
TAE-Puffer (50x)	2 M	Tris/HCl, pH 8.5
	100 mM	EDTA
	in H ₂ O	
Talon Extraktionspuffer	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	300 mM	NaCl
	in H ₂ O	
<i>Taq</i> -PCR-Puffer (10x)	100 mM	Tris/HCl, pH 8.3
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂
	in H ₂ O	

TBS-T-Puffer	10 mM 150 mM 0,05 % (v/v) in H ₂ O	Tris/HCL, pH 7.5 NaCl Tween [®] 20
TE-Puffer	10 mM 1 mM in H ₂ O	Tris/HCL, pH 8.0 EDTA
Transformationspuffer 1	30 mM 50 mM 100 mM 10 mM 15 % (v/v) in H ₂ O pH 5.8 mit Essigsäure eingestellt	Kaliumacetat MnCl ₂ ·4H ₂ O RbCl ₂ CaCl ₂ ·2H ₂ O Glyzerin
Transformationspuffer 2	10 mM 10 mM 75 mM 15 % (v/v) in H ₂ O pH 6.5 mit Natronlauge eingestellt	MOPS RbCl ₂ CaCl ₂ ·2H ₂ O Glyzerin
W-Strep-Puffer	50 mM 2,5 mM 150 mM 2 mM 0,05 % (v/v) in H ₂ O	Tris/HCL, pH 8.0 EDTA NaCl DTT Triton X-100

5.2 Methoden

5.2.1 Pflanzentechniken

5.2.1.1 Kultivierung von *A. thaliana*

Sofern nicht anders angegeben, wurden Samen von *A. thaliana* auf feuchter Erde der Sondermischung „Spezialsubstrat“ (Blumenerde Werk Ständer) ausgesät. Das Substrat bestand aus 70 % Weißtorf, 10 % Sand, 20 % Verniculit[®] (3-6 mm), 100 g/m³ Radigen[®] (Terraflor Gesellschaft), 1 L/m³ Osmocote plus und 15 g/m³ Confidor[®] WG 70 (Bayer, Leverkusen). Die Erde mit den Samen wurde nach dem Aussäen mit Frischhaltefolien abgedeckt und 3 Tage bei 4 °C vernalisiert. Anschließend wurden die Pflanzen in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen (10h Photoperiode, Lichtintensität: ~ 200 μ Einstein/(m²·s), 22 °C und 65 % Luftfeuchte) aufgezogen. Für die Samenproduktion wurden

die Pflanzen auf Langtagbedingungen verlegt (16 h Photoperiode), um frühes Blühen zu ermöglichen. Zum Sammeln der Samen wurde das Arasystem[®] System (Lehle Seeds, USA) verwendet.

5.2.1.2 Sterilisation von *A. thaliana* Samen

Für die Kultivierung von *Arabidopsis* Pflanzen auf Agarplatten mit MS-Medium wurden die Samen zuvor sterilisiert. Dazu wurde die Methode der Dampfsterilisation verwendet (Clough und Bent, 1998). Etwa 50-100 *A. thaliana* Samen wurden in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Kunststoffständer in einen Exsikator gestellt. In den Exsikator wurde 100 mL 12 %ige Hypochloritlösung gegeben und die Entwicklung von Chlorgas mit der Zugabe von 5 mL 37 %iger Salzsäure gestartet. Mit einer Membranpumpe wurde ein Vakuum angelegt, um das Gefäß abzudichten. Die Samen wurde 4-6 Stunden in der Chlorgasatmosphäre inkubiert, danach unter einer Sterilbank aus dem Exsikator entnommen und zum Ausgasen 10-15 Minuten inkubiert.

5.2.1.3 Stabile *A. thaliana* Transformation

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* wurde die „floral dip“ Methode (Clough und Bent, 1998), verwendet. *A. thaliana* Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen herangezogen und anschließend auf Langtagbedingungen transferiert. Nach circa drei Wochen kam es zur Blütenbildung. Die ersten Blüten wurden zurückgeschnitten, wodurch es nach etwa 1 Woche zu einer vermehrten Bildung von neuen Blütenständen kam. Für die Transformation wurde 200 mL YEB Medium inklusive der entsprechenden Antibiotika mit einer frischen *A. tumefaciens* Übernachtskultur angeimpft. Nach 20-stündiger Inkubation bei 28 °C wurde die Kultur 10 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert und das Pellet in 5 % (w/v) Saccharoselösung mit 0,05 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) resuspendiert. Dabei wurde eine optische Dichte ΔOD_{600} von 0,8 eingestellt. Die Pflanzen mit den verschiedenen Blütenstadien wurden zweimal für 45 Sekunden kopfüber in die Bakteriensuspension getaucht, getrocknet und anschließend in eine Plastiktüte verpackt. Die Pflanzen wurden im Anschluss unter reduzierten Lichtbedingungen über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ins Gewächshaus überführt. Nach etwa 6 Wochen wurden die Samen geerntet.

5.2.1.4 Selektion stabiler transgener Pflanzen auf Erde

Die Samen der transformierten Pflanzen (s. 5.2.1.3) wurden direkt auf Erde ausgesät und kultiviert wie zuvor beschrieben (s. 5.2.1). Eine Woche nach Keimung wurden die Pflanzen mit 0,1 % (w/v) BASTA[®] (kommerzielles Produkt auf Glufosinatbasis) besprüht. Nur

transgene Pflanzen, die das Phosphinothricin-Acetyltransferase (*PAT*) Gen trugen, überlebten. Die transgenen Pflanzen wurden zusätzlich mittels PCR oder histochemischer Färbung (bei GUS-Konstrukten) überprüft.

5.2.1.5 Segregationsanalyse auf Platte

Zur Segregationsanalyse wurde die T1 und die T2 Generation der rekombinanten *A. thaliana* Pflanzen auf MS-Festmedium selektioniert. Dazu wurden Petrischalen mit MS-Festmedium mit 10 µg/mL Phosphinotricin vorbereitet. Nach Sterilisation der Samen (s. 5.2.1.2) wurden etwa 50 Samen auf das Festmedium ausgebracht und zwei Tage bei 4 °C vernalisiert. Danach wurden die Petrischalen unter Kurztagbedingungen im Klimaschrank herangezogen. Nach etwa zwei Wochen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen normal entwickelten, resistenten, und chlorotischen, in der Entwicklung zurückgebliebenen, anfälligen Pflanzen. Die resistenten Pflanzen wurden anschließend auf Erde kultiviert.

5.2.1.6 Kultivierung von *N. benthamiana*

N. benthamiana Pflanzen wurden in Vermehrungssubstrat Typ VM (Einheitserde[®]), bestehend aus Weißtorf, Ton und Perlite (pH 6.0, Salz 1,3 g/L, N 110 mg/L, P₂O₅ 130 mg/L, K₂O 160 mg/L) unter Zugabe von 150 mg/m³ Mikronährstoffen Radigen[®] (Terraflor Gesellschaft) kultiviert. Samen wurden für drei Tage bei 4 °C vernalisiert. Sieben Tagen nach Aussäen wurden die Setzlinge pikiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert (16 h Photoperiode, Tagestemperatur 20 °C, Nachttemperatur 18 °C, Lichtintensität: ~ 100 µEinstein/(m²·s)). Etwa vier Wochen alte Pflanzen wurden für die transiente Expression verwendet.

5.2.1.7 Transiente Expression in *N. benthamiana*

Zur transienten Expression Rekombinante Proteine wurde die *Agrobacterium*-vermittelte Expression verwendet. Petrischalen mit YEB-Festmedium und den entsprechenden Antibiotika wurden aus Glycerin-Dauerkulturen der entsprechenden *Agrobacterien* beimpft und 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert. Vom Festmedium wurden 15 mL YEB Flüssigkultur mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und diese für etwa 16 h bei 28 °C auf einem Schüttler (200 Upm) inkubiert. Für die Expression von Genen unter Kontrolle des 35S-Promotors wurde zusätzlich ein *A. tumefaciens* Stamm mit dem Silencing-Inhibitor 19K angeimpft. Die Kulturen wurden bei 4000 Upm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet in Agromix resuspendiert und auf eine optische Dichte ΔOD_{600} von 0,8 verdünnt. Die Bakterien wurden anschließend vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Stamm, der

den Silencing-Inhibitor 19K trägt, wurde auf eine optische Dichte ΔOD_{600} von 8 verdünnt. Vor der Inkubation wurde dieser mit den anderen Stämmen im Verhältnis 1:9 verdünnt. Mit Hilfe einer 1 mL Spritze wurden die Bakteriensuspensionen in Blätter von *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Dabei wurden die Blätter zur Vereinfachung der Infiltration mit Hilfe einer Rasierklinge leicht eingeschnitten. Blattmaterial wurde fünf Tage nach der Infiltration in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 Schnelle Aufreinigung von DNA aus *Arabidopsis*

Die schnelle Aufreinigung von genomischer DNA aus *Arabidopsis* erfolgte nach der Methode von Klimyuk *et al.* (1993). Eine Mischung aus 150 μ L 250 mM NaOH und Blättern mit einem Durchmesser von ungefähr 1 cm wurden mit Hilfe von 10 Stahlkugeln in einem Mini-Bead-Beater-8TM (Biospec Products) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension 30 Sekunden auf 95 °C erhitzt. Durch Zugabe von 150 μ L 250 mM HCl und 75 μ L 500 mM Tris-HCl, pH 8.0 und 0,25 % Igepal CA-630 wurde die Lösung neutralisiert. Die Suspension konnte anschließend für PCR-Analysen eingesetzt werden.

5.2.2.2 Aufreinigung von DNA aus *Arabidopsis* (mit verbesserter Qualität)

Für die Klonierung genomischer Konstrukte aus *A. thaliana* wurde eine DNA Präparation unter Verwendung des Nucleon Phytopure Kits (Amersham Biociences, Braunschweig) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.2.3 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*

Etwa 50 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes Pflanzenmaterial wurden mit Hilfe von 10-15 Metallkugeln (3 mm) und einem Mini-Bead-Beater-8TM (Biospec Products) 20 Sekunden homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 1 mL Trizol[®] (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert und 1 Minute gevortext. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension erneut 1 Minute gevortext. Nach Zugabe von 0,2 mL Chloroform wurde die Probe kräftig geschüttelt und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße zur Phasenseparation zentrifugiert (15 min, 10000 g, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort zur Präzipitation mit 1 Volumen Isopropanol gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10000 g) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 10 μ L DEPC-H₂O bei

50 °C für 5 Minuten gelöst. Die Qualität der RNA-Aufreinigung und die mögliche Kontamination mit DNA wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die RNA-Konzentrationsbestimmung geschah photometrisch im BioPhotometer (Eppendorf). Eine Absorption A_{260} von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/mL. Nach der RNA-Konzentrationsbestimmung wurden alle Proben auf 1 µg/µL verdünnt und bei -80 °C gelagert.

5.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle Standard-PCRs wurden mit selbst-gereinigter Taq-Polymerase durchgeführt. Für Klonierungszwecke wurde PfuTurbo[®] (Stratagene, Heidelberg) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden auf einem PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA) durchgeführt. Ein Standardansatz enthielt: 10 ng DNA, 1x PCR Reaktionspuffer, jeweils 0,25 mM dNTPs, jeweils 0,5 µM Primer und ~0,1 U Taq-Polymerase. Das Standard-PCR-Programm war:

Phase	Temperatur/ °C	Zeit	Zyklen
Denaturierung	92	2 min	1
Denaturierung	92	30 sec	
Primerbindung	50-60	30 sec	25-40
Verlängerung	72	1 min pro kb	
Verlängerung	72	3 min	1

5.2.2.5 Punktmutagenese

Das Protokoll für die Punktmutagenese basierte auf dem Protokoll des QuickChange[®] site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Heidelberg). Der PCR-Reaktionsansatz enthielt: 10 ng Plasmid-DNA, 1x Pfu-Puffer, jeweils 280 nM Primer, 0,25 µM dNTPs und 0,05 U PfuTurbo[®] DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg).

Phase	Temperatur/ °C	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94	1 min	1
Denaturierung	94	30 sec	
Primerbindung	55	1 sec	18
Verlängerung	68	2 min pro kb	
Verlängerung	68	3 min	1

Nach der PCR wurde die Original-DNA mit *DpnI* geschnitten. Die Reaktion wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und die Endonuklease anschließend 20 Minuten bei 65 °C deaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

5.2.2.6 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Die reverse Transkription von polyA⁺-RNA und erfolgte aus 5 µg Gesamt-RNA mit Hilfe des SuperscriptIII RNA amplification kit (Invitrogen, Karlsruhe) und Oligo-dT₁₂₋₁₈-Primer nach Angaben des Herstellers.

5.2.2.7 RealTime PCR

Zur genauen Quantifizierung von cDNA wurde die Real-Time PCR auf einem ABI Prism 7700 mit zugehöriger Sequence Detection System (SDS)-Software (ABI, Darmstadt) verwendet. Die Reaktionen wurden in 8-er-Streifen der Firma ABgene (Hamburg) durchgeführt. Für jeden Reaktionsansatz von 50 µL wurden 1 µL cDNA aus der RT-PCR vorgelegt und mit dem übrigen Reaktionsansatz (1x PCR-Puffer, jeweils 0,2 µM dNTPs, 1:3000 SYBR Green, 8 % Glycerin, 3 % DMSO, ~0,1 U Taq-Polymerase, 0,2 µM Primer) aufgefüllt. Es wurden jeweils vier Wiederholungen pro Probe mittels eines Standardprogramms (2 min 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen je 30 sec 95 °C und 1 min 50-58 °C und 1,5 min 72 °C, und schließlich 3 min 72 °C) gemessen. Aus der Zunahme der Fluoreszenz jeder Probe wurde der CP (Threshold cycle) bestimmt. Der CP bestimmt die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die gesamte Auswertung wurde mit der SDS-Software und Microsoft[®] Excel durchgeführt. Die Bestimmung der Expressionsverhältnisse geschah über eine relative Quantifizierung durch Vergleich mit dem Referenzgen *Aktin*. Die Berechnung des Expressionsverhältnisses erfolgte gemäß der Formel: $R = 2^{-[\Delta CP_{Probe} - \Delta CP_{Kontrolle}]}$.

5.2.2.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien

DNA wurde aus Bakterien unter Verwendung des GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences, Braunschweig) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt. Eine Absorption A₂₆₀ von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL.

5.2.2.9 Restriktionsanalyse von DNA

Die Hydrolyse der DNA durch Restriktionsenzyme wurde unter den vom Hersteller des jeweiligen Restriktionsenzym angegeben Bedingungen durchgeführt. In der Regel wurde ein Reaktionsansatz von 20 µL mit 10 U Restriktionsenzym für eine Stunde inkubiert.

5.2.2.10 DNA Ligation

Zur Ligation wurde die Boehringer T4-DNA Ligase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Ein Ligationsansatz enthielt Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 3:1 mit einer Gesamtmenge von 200 ng. Die Ligation erfolgte über Tag bei Raumtemperatur (6-8 h).

5.2.2.11 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarosegele bestanden aus 0,5-1 % Agarose gelöst in 1x TAE-Puffer, versetzt mit 0,1 µg/mL Ethidiumbromid. Die DNA wurde mit 6x Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Es wurde eine Spannung von 100-150 Volt angelegt. Die DNA Banden wurden anschließend mittels UV Licht der Wellenlänge 360 nm sichtbar gemacht.

5.2.2.12 Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung wurde vom Labor „Automatische DNS Isolierung und Sequenzierung (ADIS)“, MPIZ Köln, durchgeführt.

5.2.2.14 Sequenzanalyse

Die Analyse von Elektropherogrammen geschah mit der Software ContigExpress (Informax). Proteinsequenzen für Vergleiche wurden in AlignX (Informax) aneinander ausgerichtet. Phylogenetische Analysen wurden ebenfalls mit AlignX (Informax) durchgeführt und phylogenetische Bäume mit ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) erstellt.

5.2.2.15 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Kulturen wurden bei 37 °C entweder auf LB-Festmedium oder als LB-Schüttelkulturen bei 200 Upm kultiviert. Übernachtskulturen wurden von LB-Festmedium angeimpft. Die Zelldichte der Kulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm im BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entsprach etwa 1×10^4 Zellen. Zur Bestimmung des Nullwertes diente das jeweilige Kulturmedium. Glycerinkulturen wurden durch Mischen einer Übernachtskultur mit 50 % Glycerin im Verhältnis 1:2 hergestellt und bei -80 °C gelagert.

5.2.2.16 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde LB-Festmedium aus einer *E. coli* Mach[®]I-Glyzerinkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde am nächsten Tag eine 5 mL Starterkultur aus CR-Medium beimpft und diese erneut über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde mit 1,5 mL dieser Übernachtskultur eine neue 100 mL Kultur CR-Medium angeimpft. Diese wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 5 min auf Eis inkubiert und danach bei 2000 g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 30 mL Transformationspuffer 1 resuspendiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 g, 4 °C, 5 min) wurden die Zellen in 4 mL Transformationspuffer 2 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zu 100 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.2.17 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurden mittels Hitzeschock-Transformation mit Plasmid-DNA transformiert. 500 ng Plasmid-DNA wurde mit 100 µL chemisch-kompetenten Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt, und direkt 1 Minute auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 mL LB-Flüssigmedium wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 g, 5 min) wurde das Bakterienpellet in 50 µL LB-Flüssigmedium aufgenommen und auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

5.2.2.18 Herstellung elektro-kompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Vier Starterkulturen aus LB-Medium mit den Antibiotika Rifampicin, Kanamycin und Gentamycin wurden mit jeweils einer frischen Kolonie GV3101 pmp90RK angeimpft. Mit jeweils zwei Starterkulturen wurden am nächsten Tag zweimal 200 mL LB-Medium ohne Antibiotika beimpft. Diese wurden bei 28 °C bis zu einer Dichte OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Die Kulturen wurden zu 50 mL aliquotiert und 20 min bei 4000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in 50 mL eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Resuspendierung in 25 mL eiskaltem Wasser wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 4 mL eiskalter 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen und jeweils 2 Aliquots zusammengeführt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 4 mL eiskalter 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen. An dieser Stelle

wurden alle Aliquots zusammengeführt und zu 40 μL aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.2.2.19 Transformation elektro-kompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Für die Transformation wurden 40 μL Aliquots auf Eis aufgetaut und 50 ng der zu transformierenden DNA zugegeben. Die Zellsuspension wurde in Elektroporationsküvetten überführt. Die Transformation wurde mit 2,5 kV, 400 Ohm und 25 μF durchgeführt. Die elektroporierten Zellen wurden mit 1 mL YEB Medium aus der Elektroporationsküvette gespült, in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, und 1 Stunde bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler inkubiert. 15 μL des Transformationsansatzes wurden auf YEB-Festmedium mit den Antibiotika Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin und Carbenicillin ausplattiert. Die Platte wurde 3 Tage bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

5.2.2.20 Kultivierung von *A. tumefaciens* Stämmen

Agrobacterium Stämme wurden von den Glycerin-Dauerkulturen zunächst immer auf YEB-Agar Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Platten waren mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, für die die verwendeten Stämme Resistenzen trugen. Mehrere auf diesen Platten gewachsene Kolonien wurden dazu verwendet, YEB Flüssigmedien mit entsprechenden Antibiotika anzuimpfen. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler inkubiert.

100 ng Plasmid-DNA wurde mit 40 μL *A. tumefaciens* Zellen auf Eis gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten pipettiert. Die Elektroporation wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Kapazität 125 μF + 25 μF , Widerstand 400 Ω , Spannung 2,5 kV. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 mL YEB-Flüssigmedium aufgenommen und 2 h bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler inkubiert. 15 μL der Kultur wurden auf YEB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und drei Tage bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

5.2.3 Biochemische Methoden

5.2.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Übernachtskulturen von *E. coli* Expressionsstämmen wurden mit Kolonien angeimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler (200 Upm) über Nacht inkubiert. Aus dieser Übernachtskultur wurde eine frische 50 mL Kultur angeimpft und diese bis zu einer optischen Dichte ΔOD_{600} von 0,8 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid) mit einer Endkonzentration von

1 mM induziert. Nach 4 weiteren Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 Upm, 20 min, 4 °C) sedimentiert. Bis zur Aufreinigung der Proteine wurden die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

5.2.3.2 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Der Aufschluss der Zellen wurde durch das vom pLysS Vektor exprimierte Lysozym vereinfacht. Dazu wurden die Zellpellets (s. 5.2.3.1) unter Zugabe von 5 mL Talon-Extraktionspuffer aufgetaut. Durch das Einfrieren und Auftauen werden die Plasmamembranen einiger Zellen zerstört und das darin enthaltene Lysozym freigesetzt. Dadurch werden die Zellwände aller Zellen abgebaut. Für einen vollständigen Aufschluss wurde zusätzlich eine Ultraschallbehandlung der Zellen vorgenommen. Dabei wurden 3-mal jeweils 15 Pulse mit einem Ultraschallgeber gesetzt. Die dabei entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (4000 Upm, 20 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde mit 100 µL Kobalt-Chelat (Talon, BD Biosciences) bei 4 °C für 30 Minuten auf einem Rollrad inkubiert. Nach dem Sedimentieren des Kobalt-Chelats durch Zentrifugation (700 g, 4 °C, 5 min) wurde dieses zweimal 10 Minuten mit 10 mL Talon-Extraktionspuffer gewaschen. Die Proteine wurden mit zweimal 100 µL Talon-Elutionspuffer von dem Kobalt-Chelat eluiert.

5.2.3.3 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde der Bio-Rad Poteinassay verwendet, der nach dem von Bradford (1976) beschriebenen Prinzip arbeitet. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in Wasser verwendet. Die Kalibrierungskurve wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] erstellt und die Konzentration der Proteinproben daraus berechnet.

5.2.3.4 Pflanzengesamtproteinextraktion

Jeweils 0,5 g gefrorenes Blattmaterial, bzw. 1 g nach Infiltration mit Wasser, wurde mit 1 mL Proteinextraktionspuffer auf Eis unter Verwendung eines Mörsers homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat bei 4 °C für 15 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und je nach weiterer Verwendung mit SDS-Probenpuffer versetzt.

5.2.3.5 Proteinaufreinigung mittels StrepII-Epitop-tag

Die Proteinaufreinigung mittels StrepII-Epitop-tag wurde nach Witte *et al.* (2004) durchgeführt. Gesamtprotein wurde wie zuvor (s. 5.2.2.3) gewonnen. Dem Extraktionspuffer

wurde dabei 100 µg/mL Avidin zugesetzt, um unspezifische Bindungen biotinylierter Proteine zu minimieren. Nach Zugabe von 100 µL Streptactin Macrorep (IBA; Göttingen) wurde die Suspension 20 Minuten auf einem Rollrad bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine Mini-Säule (BioRad, München) überführt. Der Durchfluss wurde verworfen und das Macrorep zweimal mit 1 mL und viermal mit 0,5 mL W-Strep-Puffer gewaschen. Für die Nanospray-Tandem-MS Untersuchungen wurde das Macrorep vier weitere Male mit W-Strep-Puffer ohne Triton X-100 gewaschen, um das Detergenz vollständig zu entfernen. Danach wurde das gereinigte Protein mit 100 µL Strep-Elutionspuffer 5 Minuten gewaschen, anschließend 5 Minuten mit 100 µL Strep-Elutionspuffer inkubiert und eluiert. Alternativ wurde das Protein vom Macrorep durch 5-minütiges Kochen in SDS-Probenpuffer gelöst.

5.2.3.6 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese

Für die denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Mini-PROTEAN[®] 3 Gelkammern von BioRad (München) und diskontinuierliche Polyacrylamidgele verwendet. Die Gele wurden am Tag der SDS-Gelelektrophorese frisch zubereitet. Die Elektrophorese wurde nach der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Proteine wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C gekocht und anschließend aufgetragen. Zum Einlauf ins Trenngel wurde eine konstante Voltzahl von 90 Volt eingestellt, für die Auftrennung wurde die Voltzahl auf 120-150 Volt erhöht.

5.2.3.7 Proteinfärbung in SDS-Gelen

Proteine in SDS-Gelen wurden mittels PageBlue[™] (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

5.2.3.8 Gesamtproteinextraktion für die 2D-Gelelektrophorese

Die Aufreinigung von Gesamtprotein erfolgte durch Phenol/SDS Extraktion nach der Methode von Wang *et al.* (2003). 100 mg *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in Mikroreaktionsgefäße gefüllt. Das Pulver wurde in 2 mL eiskaltem Aceton resuspendiert. Nach 30 Sekunden Mischen wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert (3 min, 10000 g). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Pellet wurde in 10 % TCA (gelöst in Aceton) aufgenommen und in einem Ultraschallbad weiter homogenisiert. Durch Zentrifugation (3 min, 10000 g) wurde das Pellet erneut sedimentiert und bis zu 3-4-mal in 10 % TCA in Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Pellet zweimal in 10 % TCA (gelöst in H₂O) und zweimal mit 80 %igem eiskaltem Aceton

gewaschen. Dabei wurde das Pellet wie zuvor durch Mischen gelöst und durch Zentrifugation sedimentiert. Abschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pulver wurde in 0,8 mL Phenol (Tris-gepuffert, pH 8.0) und 0,8 mL dichtem SDS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 30 Sekunden durch Vortexen gemischt und die Phenolphase durch Zentrifugation (3 min, 10000 g) separiert. Die Phenolphase wurde in neue Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Zur Proteinfällung wurden 5 Volumen Methanol mit 0,1 M Ammoniumacetat zugegeben und die Mischung 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden durch Zentrifugation (5 min, 10000 g) sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Methanol/Ammoniumacetat und zweimal mit 80 %igem eiskaltem Aceton gewaschen. Zur Proteinmengenbestimmung wurden Aliquots in 50 mM Tris, pH 8.0 und 8 M Harnstoff gelöst.

5.2.3.9 2D-Gelelektrophorese und ProQ-Diamond Färbung

Die 2D-Gelelektrophorese und die Färbungen der Gele mit ProQ-Diamond (Molecular Probes) und Coomassie Brilliant Blue wurde von der MALDI-TOF Service-Einheit unter Leitung von Jürgen Schmidt (MPIZ, Köln) durchgeführt. Für die isoelektrische Fokussierung wurde das ZOOM[®] IPGRunner[™] System mit nicht-linearen ZOOM[®] IPG Strips im pH Bereich 4-7 von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Für die Auftrennung nach Molekulargewicht wurden Gele aus dem NuPAGE System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Durchführung verlief nach von den Herstellern vorgegebenen Protokollen. Die Auswertung der 2D-Gele wurde mit der Software Proteomweaver[®] 2.2 (Definiens, München) durchgeführt.

5.2.3.10 Kinaseaktivitätsbestimmungen

Gereinigte Kinasen wurden in einem Kinasetest mit Syntide2 als Peptidsubstrat verwendet. Vergleichbare Kinasmengen wurden durch Proteinmengenbestimmung nach His-Aufreinigung oder durch Western-Blots nach StrepII-Aufreinigung eingestellt. Ein Standard-Kinaseansatz von 30 µL enthielt: 50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 10 µM Syntide2, 100 µM ATP und 3 µCi [γ -³²P]-ATP. Die Kinase-reaktionen wurden nach 10-15 Minuten durch Pipettieren von 15 µL Reaktionsansatz auf Anionenaustauscher-Papier (P81) gestoppt. Das Papier wurde mit 1 %iger Phosphorsäure gewaschen und die verbleibende Radioaktivität mittels Szintillationszählung bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Prism[®] (GraphPad Software, USA).

5.2.3.11 K_i -Bestimmungen

Zur K_i -Bestimmung wurden *in vitro* Kinaseversuche mit Syntide2 als Peptidsubstrat durch steigende Konzentrationen von Inhibitor oder Alternativsubstrat blockiert. Die Bestimmung erfolgte wie in (s. 5.2.3.10) beschrieben. Um den Einfluss unterschiedlicher K_M -Werte zwischen den untersuchten Kinasen auszuschließen, wurden nur femtomolare Mengen ATP im Versuchsansatz verwendet. Der Kinaseansatz enthielt: 50 mM HEPES, 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EGTA, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM DTT, 10 μ M Syntide2 und 3 μ Ci $[\gamma\text{-}^{32}P]$ -ATP. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen von 1-NA-PP1 (Biolog, Bremen) oder N6-Benzyl-ATP (Toronto Research Chemicals, Kanada) zugegeben. Die Berechnung der Inhibitorkonzentration, bei der die Kinaseaktivität sich halbiert hatte (IC_{50} -Werte), erfolgte durch nicht-lineare Regression mit der Software Prism[®] (GraphPad Software, USA). Die K_i -Werte entsprachen bei den eingesetzten ATP-Konzentrationen den IC_{50} -Werten:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \left(\frac{[ATP]}{K_{M,ATP}} \right)}$$

5.2.3.12 Histochemische Färbung der β -Glucuronidase-Aktivität

Pflanzenmaterial für die GUS-Färbung wurde in passenden Reaktionsgefäßen mit GUS-Lösung überschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden in einem Exsikator dreimal für jeweils 1 Minute unter Vakuum gesetzt. Die Gefäße wurden verschlossen, über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend mit deionisiertem Wasser abgespült und die Pflanzen in 70 % Ethanol entfärbt. Die Waschlösung wurde mehrmals gewechselt, bis unspezifische Färbungen der Pflanzenteile vollständig entfernt waren. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Pflanzenteile in 70 % Ethanol gelagert.

5.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopie wurde durchgeführt, um Pollenkörner und Trichome von Col-0 mit *cpk2-1* Pflanzen zu vergleichen. Proben wurden durch Tissue-Tek auf dem Präparatehalter fixiert und mit flüssigem Stickstoff im Hochvakuum schockgefroren. Die Proben wurden unter Vakuum in das Rasterelektronenmikroskop (Zeiss DSM 940 SEM; CarlZeiss NTS GmbH) übertragen, wo sie mit Gold bedampft und analysiert wurden.

5.2.5 Funktionelle Tests zur Pollenkeimung

5.2.5.1 *In-vitro* Keimung von *Arabidopsis* Pollen

Für die Pollenwachstumsversuche wurde Pollenwachstumsmedium aufgeköcht und auf einem Objektträger erkalten lassen. Die Pollen wurden durch Abstreifen auf das Medium auf dem Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer in Dunkelheit für 4 Stunden inkubiert. Die Auswertung der Pollenkeimung fand durch Auszählen der Pollenschläuche unter dem Mikroskop statt. Die Pollenschlauchlänge wurde mikroskopisch mit der Software Diskus (TBK Hilgers, Königswinter) bestimmt.

5.2.5.2 Fluorescein-Diacetat Färbung

Pollenwachstumsmedium (Stadler *et al.*, 1999) wurde aufgeköcht und auf einem Objektträger erkalten lassen. Pollenkörner wurden durch Abstreifen auf dem Wachstumsmedium auf dem Objektträger fixiert. Die Pollenkörner wurden durch Zugabe von FDA-Färbelösung gefärbt und sofort mikroskopisch analysiert. Die Analyse fand durch Auszählen statt.

5.2.6 Proteinmodellierungen

Proteinmodelle wurden mit den Softwareprogrammen „Swiss-Prot PDB-Viewer“ und „Modeller“ auf der Basis von sequenzähnlichen Kinasen erstellt. Die graphische Bearbeitung erfolgte mit der Software POV-RayTM V3.6 (Persistence of Vision, USA).

5.2.7 Chemisch-genetische Methoden

5.2.7.1 Synthese von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-N}^6\text{-Benzyl-ATP}$ mittels Nukleosid-Diphosphokinase

Die Synthese von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-N}^6\text{-Benzyl-ATP}$ erfolgte gemäß der von Böhmer (2002) beschriebenen Methode. Das *E. coli* Enzym Nukleosiddiphosphokinase wurde mit dem γ -Phosphat von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ beladen. Nach Gelfiltration des Enzyms mittels P6-Zentrifugenröhrchen (BioRad, München) wurde das γ -Phosphat auf $\text{N}^6\text{-Benzyl-ADP}$ (Biolog, Bremen) übertragen. Die Effizienz dieser Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Böhmer, 2002) ermittelt.

5.2.7.2 Kultivierung von *A. thaliana* in hydroponischen Schüttelkulturen

Etwa 30-40 sterile Samen von *A. thaliana* wurden in 50 mL MS-Medium (MS-Medium (Duchefa) mit 1% Saccharose) in einem 200 mL Erlenmeyerkolben mit Zellstoffstopfen ausgebracht. Die Kolben wurden auf einem Schüttler (100 Upm) in einer Klimakammer unter

konstanten Lichtbedingungen (24h Photoperiode, Lichtintensität: $\sim 100 \mu\text{Einstein}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 21 °C und 65 % Luftfeuchte) aufgezogen.

5.2.8 Massenspektrometrie

5.2.8.1 Proteinspaltung durch Trypsin in Lösung

Aufgereinigten Proteinen wurde 5 ng/ μL Trypsin Gold in 25mM NH_4HCO_3 zugegeben und die Proteine 4 Stunden bei 21 °C verdaut.

5.2.8.2 Proteinspaltung durch Trypsin im Gel

Aufgereinigtes Protein aus der StrepII-Aufreinigung (s. 5.2.3.5) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Proteinbanden nach Färbung ausgeschnitten. Gelfragmente wurden zweimal mit 66,6 % Acetonitril/8,3 mM Ammoniumbicarbonat für 15 min dehydriert und mit 25 mM Ammoniumbicarbonat rehydriert. Dann wurden die Gelstücke erneut dehydriert und 30 min in einer SpeedVac bei 30 °C getrocknet. Die Fragmente wurden durch Rehydrierung in 10 mM DTT in 25 mM Ammoniumbicarbonat 1 h bei 65°C reduziert. Anschließend wurde die überschüssige DTT-Lösung abpipettiert und die Gelfragmente zur Alkylierung in 55 mM Iodoacetamid in 25 mM Ammoniumbicarbonat für 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 25 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und die Fragmente in der SpeedVac 30 min bei 30 °C getrocknet. Die Gelfragmente wurden 4 h mit 0,21 μM Trypsin-Gold in 25 mM Ammoniumbicarbonat inkubiert. Die Peptide diffundieren nach der Inkubation mit Trypsin aus dem Gelfragment in die Lösung, welche daraufhin in ein neues Gefäß pipettiert werden kann. Um alle Peptide aus dem Gelfragment zu eluieren, wurde das Fragment erneut dehydriert, die Lösung in ein neues Gefäß pipettiert und das Acetonitril in der SpeedVac verdampft.

5.2.8.3 Entsalzung mittels ZipTip C18

Zur Entsalzung der noch immer stark salzhaltigen Peptidlösungen wurden ZipTip C₁₈ Pipettenspitzen der Firma Waters (USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Als Benetzungs- und Elutionslösung diente 50 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA). Als Wasch- und Equilibrierungslösung diente 0,1 % TFA in H₂O.

5.2.8.4 Nanospray-MS/MS Analyse

Zur Identifikation von Phosphorylierungsstellen in AtCPK1 und AtCPK2 wurde eine Nanospray-Q-TOF Analyse durchgeführt. Aus den entsalzten Peptidgemischen wurden

phosphorylierte Peptide durch Vergleiche mit theoretischen Vorhersagen einfach- und zweifacher Phosphorylierungen (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msdigest.htm>) identifiziert. Analyse der Massenspektren geschah mittels der Software MassLynx V4.0 (Waters, Großbritannien).

6 Literatur

- Abbasi, F., Onodera, H., Toki, S., Tanaka, H., und Komatsu, S.** (2004). OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol.Biol.* **55**, 541-552.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., und Schroeder, J.I.** (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**, 1053-1057.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K., Shimazaki, C.T., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., Tsien, R.Y., Harper, J.F., Chory, J., und Schroeder, J.I.** (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* **289**, 2338-2342.
- Allen, J., Lazerwith, S., und Shokat, K.** (2005). Bio-orthogonal Affinity Purification of Direct Kinase Substrates. *J Am Chem Soc* **127**, 5288 - 5289.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., und Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Amrein, H., Makart, S., Granada, J., Shakya, R., Schneider-Pokorny, J., und Dudler, R.** (2004). Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301 D-R. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 90-97.
- Anil, V.S., Harmon, A.C., und Rao, K.S.** (2003). Temporal association of Ca²⁺-dependent protein kinase with oil bodies during seed development in *Santalum album* L.: Its biochemical characterization and significance. *Plant Cell Physiol.* **44**, 367-376.
- Asano, T., Tanaka, N., Yang, G., Hayashi, N., und Komatsu, S.** (2005). Genome-Wide Identification of the Rice Calcium-Dependent Protein Kinase and Its Closely Related Kinase Gene Families: Comprehensive Analysis of the CDPKs Gene Family in Rice. *Plant Cell Physiol.* **46**, 356-366.
- Bardwell, L., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R., und Thorner, J.** (1998). Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* **12**, 2887-2898.

- Bate, N., und Twell, D.** (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol.Biol.* **37**, 859-869.
- Berberich, T., und Kusano, T.** (1997). Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 275-283.
- Bishop, A.C., Buzko, O., und Shokat, K.M.** (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol* **11**, 167-172.
- Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., und Shokat, K.M.** (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* **8**, 257-266.
- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O., und Shokat, K.M.** (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401.
- Böhmer, M.** (2002). Suche nach Zielproteinen der Don3-Proteinkinase aus *Ustilago maydis*. In der Biologie, Abteilung Genetik (Marburg: Philipps Universität), pp. 101.
- Böhmer, M., Kurth, J., Witte, C.P., und Romeis, T.** (2006). Function of plant Calcium-dependent protein kinases in the activation of abiotic and pathogen-related stress responses and its potential application in the generation of stress-resistant plants. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues* (1st Edition), J.A. Teixeira da Silva, ed (London, UK: Global Science Books).
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brewbaker, J.L., und Kwack, B.H.** (1963). The Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *American Journal of Botany* **50**, 859-865.
- Bucher, P., und Bairoch, A.** (1994). A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 53-61.
- Cano, E., Hazzalin, C.A., und Mahadevan, L.C.** (1994). Anisomycin-Activated Protein Kinase-P45 and Kinase-P55 but Not Mitogen-Activated Protein Kinase-Erk-1 and Kinase-Erk-2 Are Implicated in the Induction of C-Fos and C-Jun. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7352-7362.
- Carroll, A.S., Bishop, A.C., DeRisi, J.L., Shokat, K.M., und O'Shea, E.K.** (2001). Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12578-12583.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., und Young, R.A.** (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**, 323-337.

- Chaudhuri, S., Seal, A., und DasGupta, M.** (1999). Autophosphorylation-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase from groundnut. *Plant Physiol.* **120**, 859-866.
- Chehab, E.W., Patharkar, O.R., Hegeman, A.D., Taybi, T., und Cushman, J.C.** (2004). Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant Physiol.* **135**, 1430-1446.
- Cheng, S.H., Sheen, J., Gerrish, C., und Bolwell, G.P.** (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett.* **503**, 185-188.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., und Sheen, J.** (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**, 469-485.
- Clough, S.J., und Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Collins, M.O., Yu, L., Husi, H., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., und Grant, S.G.** (2005). Robust enrichment of phosphorylated species in complex mixtures by sequential protein and peptide metal-affinity chromatography and analysis by tandem mass spectrometry. *Sci STKE* **2005**, pl6.
- Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O., und Thomashow, M.F.** (2004). A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15243-15248.
- Cook, J.G., Bardwell, L., und Thorner, J.** (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**, 85-88.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G., und Harper, J.F.** (2003). Subcellular Targeting of Nine Calcium-Dependent Protein Kinase Isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 1840-1848.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., und Cohen, P.** (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95-105.
- Edwards, D.R., und Mahadevan, L.C.** (1992). Protein-Synthesis Inhibitors Differentially Superinduce C-Fos and C-Jun by 3 Distinct Mechanisms - Lack of Evidence for Labile Repressors. *Embo J.* **11**, 2415-2424.
- Ellard-Ivey, M., Hopkins, R.B., White, T.J., und Lomax, T.L.** (1999). Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Mol.Biol.* **39**, 199-208.
- Estruch, J.J., Kadwell, S., Merlin, E., und Crossland, L.** (1994). Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8837-8841.

- Evans, N.H., McAinsh, M.R., und Hetherington, A.M.** (2001). Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin Plant Biol.* **4**, 415-420.
- Fan, Q.W., Zhang, C., Shokat, K.M., und Weiss, W.A.** (2002). Chemical genetic blockade of transformation reveals dependence on aberrant oncogenic signaling. *Curr Biol* **12**, 1386-1394.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., und Whitehouse, C.M.** (1990). Electrospray Ionization-Principles and Practice. *Mass Spectrometry Reviews* **9**, 37-70.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., und Parker, J.E.** (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. *Plant Cell* **17**, 2601-2613.
- Flor, H.H.** (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**, 653-669.
- Flor, H.H.** (1946). Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J. Agric.Res.* **73**, 335-357.
- Flores, H.E., Protacio, C.M., und Signs, M.W.** (1989). Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. In *Plant Nitrogen Metabolism*, J.E. Poulton, J.T. Romeo, und E.E. Conn, eds (New York: Plenum Press), pp. 329-393.
- Freymark, G.** (2005). *In vivo*-Untersuchungen von Konformations-Änderungen der Calcium-abhängigen Protein-Kinase NtCDPK2 aus *Nicotiana tabacum*. . In Department of Biology (Marburg: Philipps Universität Marburg).
- Gillespie, P.G., Gillespie, S.K., Mercer, J.A., Shah, K., und Shokat, K.M.** (1999). Engineering of the myosin-ibeta nucleotide-binding pocket to create selective sensitivity to N(6)-modified ADP analogs. *J Biol Chem* **274**, 31373-31381.
- Glinski, M., Romeis, T., Witte, C.P., Wienkoop, S., und Weckwerth, W.** (2003). Stable isotope labeling of phosphopeptides for multiparallel kinase target analysis and identification of phosphorylation sites. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 1579-1584.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., und Mansfield, J.** (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **23**, 441-450.
- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., und Connelly, P.A.** (1996). Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **271**, 695-701.
- Harmon, A.C., Yoo, B.C., und McCaffery, C.** (1994). Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7278-7287.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., und Harper, J.F.** (2000). CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* **5**, 154-159.

- Harmon, A.C., Gribskov, M., Gubrium, E., und Harper, J.F.** (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytol* **151**, 175-183.
- Harper, J.F., und Harmon, A.** (2005). Plants, symbiosis and parasites: A calcium signalling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 555-566.
- Harper, J.F., Binder, B.M., und Sussman, M.R.** (1993). Calcium and lipid regulation of an Arabidopsis protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 3282-3290.
- Harper, J.F., Huang, J.F., und Lloyd, S.J.** (1994). Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7267-7277.
- Hegeman, A.D., Harms, A.C., Sussman, M.R., Bunner, A.E., und Harper, J.F.** (2004). An isotope labeling strategy for quantifying the degree of phosphorylation at multiple sites in proteins. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 647-653.
- Heslop-Harrison, J., und Heslop-Harrison, Y.** (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol* **45**, 115-120.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., und Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucl. Acids Res.* **27**, 297-300.
- Hong, Y., Takano, M., Liu, C.M., Gasch, A., Chye, M.L., und Chua, N.H.** (1996). Expression of three members of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **30**, 1259-1275.
- Honys, D., und Twell, D.** (2003). Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. *Plant Physiol.* **132**, 640-652.
- Hrabak, E.M., Dickmann, L.J., Satterlee, J.S., und Sussman, M.R.** (1996). Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **31**, 405-412.
- Huang, J.F., Teyton, L., und Harper, J.F.** (1996). Activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. *Biochemistry* **35**, 13222-13230.
- Huang, J.Z., und Huber, S.C.** (2001). Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1079-1087.
- Huber, S.C., und Huber, J.L.** (1996). Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 431-444.
- Ihle, J.N.** (2000). The challenges of translating knockout phenotypes into gene function. *Cell* **102**, 131-134.
- Ivashuta, S., Liu, J., Liu, J., Lohar, D.P., Haridas, S., Bucciarelli, B., Vandenbosch, K.A., Vance, C.P., Harrison, M.J., und Gantt, J.S.** (2005). RNA Interference Identifies a Calcium-Dependent Protein Kinase Involved in *Medicago truncatula* Root Development. *Plant Cell*.

- Jaffe, L.A., Weisenseel, M.H., und Jaffe, L.F.** (1975). Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. *J Cell Biol* **67**, 488-492.
- Johnson, R.S., Martin, S.A., Biemann, K., Stults, J.T., und Watson, J.T.** (1987). Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem* **59**, 2621-2625.
- Joosten, M., und de Wit, P.** (1999). THE TOMATO-CLADOSPORIUM FULVUM INTERACTION: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Phytopathol* **37**, 335-367.
- Kange, R., Selditz, U., Granberg, M., Lindberg, U., Ekstrand, G., Ek, B., und Gustafsson, M.** (2005). Comparison of different IMAC techniques used for enrichment of phosphorylated peptides. *J Biomol Tech* **16**, 91-103.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D.Y., und Guy, C.L.** (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**, 4159-4168.
- Klimyuk, V., Carroll, B., Thomas, C., und Jones, J.** (1993). Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.* **3**, 493-494.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N., und Heyer, A.G.** (2004). Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of Arabidopsis thaliana with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1395-1404.
- Knight, M.R.** (2002). Signal transduction leading to low-temperature tolerance in Arabidopsis thaliana. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 871-875.
- Koncz, C., und Schell, J.** (1986). The Promoter of TI-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kraybill, B.C., Elkin, L.L., Blethrow, J.D., Morgan, D.O., und Shokat, K.M.** (2002). Inhibitor scaffolds as new allele specific kinase substrates. *J Am Chem Soc* **124**, 12118-12128.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., und Harper, J.F.** (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* **130**, 2129-2141.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L., und Shokat, K.M.** (1998). Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem Biol* **5**, 91-101.
- Lu, S.X., und Hrabak, E.M.** (2002). An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **128**, 1008-1021.

- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., and Grisse, W.** (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**, S389-400.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D., and Romeis, T.** (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10736-10741.
- Malhó, R., Moutinho, A., van der Luit, A., and Trewavas, A.J.** (1998). Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Philos Trans R Soc Lond B* **353**, 1463-1473.
- Martin, K., Steinberg, T.H., Cooley, L.A., Gee, K.R., Beechem, J.M., and Patton, W.F.** (2003). Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. *Proteomics* **3**, 1244-1255.
- McMichael, R.W., and Huber, S.C.** (1995). Sucrose-Phosphate Synthase Is Inactivated by a Calcium- Dependent Protein-Kinase. *Plant Physiol.* **108**, 142-142.
- Mehdy, M.C.** (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* **105**, 467-472.
- Meier, C.** (2002). cycloSal-pronucleotides design of chemical trojan horses. *Mini Rev Med Chem* **2**, 219-234.
- Miller, D.D., Callahan, D.A., Gross, D.J., and Hepler, P.K.** (1992). Free Ca²⁺ Gradient in Growing Pollen Tubes of Liliium. *Journal of Cell Science* **101**, 7-12.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., and Gooley, A.A.** (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 837-844.
- Monroy, A.F., and Dhindsa, R.S.** (1995). Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. *Plant Cell* **7**, 321-331.
- Monroy, A.F., Sangwan, V., and Dhindsa, R.S.** (1998). Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J.* **13**, 653-660.
- Morgan, D.O.** (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Moutinho, A., Trewavas, A.J., and Malho, R.** (1998). Relocation of a Ca²⁺-dependent protein kinase activity during pollen tube reorientation. *Plant Cell* **10**, 1499-1510.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D.** (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* **135**, 1113-1128.

- Ndimba, B.K., Chivasa, S., Hamilton, J.M., Simon, W.J., und Slabas, A.R.** (2003). Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* **3**, 1047-1059.
- Niswender, C.M., Ishihara, R.W., Judge, L.M., Zhang, C., Shokat, K.M., und McKnight, G.S.** (2002). Protein engineering of protein kinase A catalytic subunits results in the acquisition of novel inhibitor sensitivity. *J Biol Chem* **277**, 28916-28922.
- Nühse, T., Stensballe, A., Jensen, O., und Peck, S.** (2004). Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell* **16**, 2394 - 2405.
- Obermeyer, G., und Weisenseel, M.H.** (1991). Calcium channel blocker and calmodulin antagonists affect the gradient of free calcium ions in lily pollen tubes. *Eur J Cell Biol* **56**, 319-327.
- Oort, A.J.P.** (1944). Onderzoekingen over stuifbrand. II. Overgevoeligheid voor stuifbrand (*Ustilago tritici*). *Tijdschr. Plantenziekten* **50**, 73–106.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., und Marks, M.D.** (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell* **67**, 483-493.
- Pagnussat, G.C., Fiol, D.F., und Salerno, G.L.** (2002). A CDPK type protein kinase is involved in rice SPS light modulation. *Physiol Plant* **115**, 183-189.
- Papa, F., Zhang, C., Shokat, K., und Walter, P.** (2003). Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science* **302**, 1533 - 1537.
- Patterson, B.D., und Graham, D.** (1987). Temperature and metabolism. In *The Biochemistry of Plants* (New York: Academic Press), pp. 153-199.
- Peck, S.C.** (2005). Update on Proteomics in Arabidopsis. Where Do We Go From Here? *Plant Physiol.* **138**, 591-599.
- Pical, C., Fredlund, K.M., Petit, P.X., Sommarin, M., und Moller, I.M.** (1993). The Outer-Membrane of Plant-Mitochondria Contains a Calcium-Dependent Protein-Kinase and Multiple Phosphoproteins. *FEBS Lett.* **336**, 347-351.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Shipley, A.M., Rivers, B.A., Cresti, M., und Hepler, P.K.** (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* **6**, 1815-1828.
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., und Somerville, S.** (2005). Loss-of-Function Mutations in Chitin Responsive Genes Show Increased Susceptibility to the Powdery Mildew Pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* **138**, 1027-1036.
- Rathore, K.S., Cork, R.J., und Robinson, K.R.** (1991). A cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev Biol* **148**, 612-619.
- Reddy, V.S., und Reddy, A.S.N.** (2004). Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* **65**, 1745-1776.

- Roepstorff, P., und Fohlman, J.** (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., und Fernie, A.R.** (2001). Metabolic Profiling Allows Comprehensive Phenotyping of Genetically or Environmentally Modified Plant Systems. *Plant Cell* **13**, 11-29.
- Romeis, T., Piedras, P., und Jones, J.D.** (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. *Embo J.* **20**, 5556-5567.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., und Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., und Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol.Biol.* **53**, 247-259.
- Rudd, J.J., und Franklin-Tong, V.E.** (2001). Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. *New Phytol* **151**, 7-33.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C., und Schaller, A.** (2002). LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol.* **129**, 156-168.
- Saha, P., und Singh, M.** (1995). Characterization of a winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) protein kinase with calmodulin-like domain: regulation by autophosphorylation. *Biochem J* **305 (Pt 1)**, 205-210.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., und Izui, K.** (2000). Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* **23**, 319-327.
- Sandal, N.N., Bojsen, K., und Marcker, K.A.** (1987). A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucleic Acids Res* **15**, 1507-1519.
- Sanders, D., Brownlee, C., und Harper, J.F.** (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706.
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M.G., Willmitzer, L., Fernie, A.R., und Kopka, J.** (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett.* **579**, 1332-1337.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G., und Hulskamp, M.** (2002). TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *Embo J.* **21**, 5036-5046.

- Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C., und Shokat, K.M.** (1997). Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3565-3570.
- Sheen, J.** (1996). Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**, 1900-1902.
- Shokat, K., und Velleca, M.** (2002). Novel chemical genetic approaches to the discovery of signal transduction inhibitors. *Drug Discov. Today* **7**, 872-879.
- Sieg, D.J., Ilic, D., Jones, K.C., Damsky, C.H., Hunter, T., und Schlaepfer, D.D.** (1998). Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *Embo J.* **17**, 5933-5947.
- Spengler, B.** (1997). Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 1019-1036.
- Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M., und Sauer, N.** (1999). The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant J.* **19**, 269-278.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., und Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Trewavas, A.** (1999). Le calcium, C'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiol.* **120**, 1-6.
- Trewavas, A.** (2000). Signal Perception and Transduction. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B. Buchanan, W. Gruissem, und R.L. Jones, eds (American Society of Plant Physiologists).
- Twell, D., Yamaguchi, J., und McCormick, S.** (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* **109**, 705-713.
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., und Shinozaki, K.** (1994). Two genes that encode Ca^{2+} -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* **244**, 331-340.
- Vazquez, M.L., Zhang, C., und Shokat, K.** (2002). Chemical genetics may reveal the mode of action of cytokinin plants hormones. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **223**, 291-CHED.
- Vitart, V., Christodoulou, J., Huang, J.F., Chazin, W.J., und Harper, J.F.** (2000). Intramolecular activation of a Ca^{2+} -dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. *Biochemistry* **39**, 4004-4011.

- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., und Thomashow, M.F.** (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant J.* **41**, 195-211.
- von Roepenack-Lahaye, E., Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., Schmidt, J., Scheel, D., und Clemens, S.** (2004). Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiol.* **134**, 548-559.
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y., und Okada, K.** (1997). Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC. *Science* **277**, 1113-1116.
- Wallace, W., Secor, J., und Schrader, L.E.** (1984). Rapid accumulation of gamma-aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness or mechanical manipulation. *Plant Physiol.* **75**, 170-175.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., und Cresti, M.** (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**, 2369-2375.
- Wäspi, U., Blanc, D., Winkler, T., Ruedi, P., und Dudler, R.** (1998). Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 727-733.
- Weiss, E.L., Bishop, A., Shokat, K., und Drubin, D.G.** (2000). Chemical genetic analysis of the budding yeast p21-activated kinase Cla4p. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1813.
- Weiss, E.L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D.G., und Luca, F.C.** (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol* **158**, 885-900.
- Weljie, A.M., und Vogel, H.J.** (2004). Unexpected structure of the Ca²⁺-regulatory region from soybean calcium-dependent protein kinase-alpha. *J Biol Chem.*
- Wiener, M., Sachs, J., Deyanova, E., und Yates, N.** (2004). Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Anal Chem* **76**, 6085 - 6096.
- Wilm, M., und Mann, M.** (1996). Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry* **68**, 1-8.
- Witte, C.P., Noel, L.D., Gielbert, J., Parker, J.E., und Romeis, T.** (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol.Biol.* **55**, 135-147.

- Witucki, L.A., Huang, X., Shah, K., Liu, Y., Kyin, S., Eck, M.J., und Shokat, K.M.** (2002). Mutant tyrosine kinases with unnatural nucleotide specificity retain the structure and phospho-acceptor specificity of the wild-type enzyme. *Chem Biol* **9**, 25-33.
- Wymer, C.L., Bibikova, T.N., und Gilroy, S.** (1997). Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **12**, 427-439.
- Xing, T., Higgins, V.J., und Blumwald, E.** (1997). Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* **9**, 249-259.
- Xing, T., Wang, X.J., Malik, K., und Miki, B.L.** (2001). Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1261-1264.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., und Yamaguchi, S.** (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**, 367-378.
- Yoo, B.C., und Harmon, A.C.** (1996). Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **35**, 12029-12037.
- Yoon, G.M., Cho, H.S., Ha, H.J., Liu, J.R., und Lee, H.S.P.** (1999). Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol.Biol.* **39**, 991-1001.
- Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S., und Stacey, G.** (2002). Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 963-970.
- Zhang, C., Kenski, D., Paulson, J., Bonshtien, A., Sessa, G., Cross, J., Templeton, D., und Shokat, K.** (2005). A second-site suppressor strategy for chemical genetic analysis of diverse protein kinases. *Nat Methods* **2**, 435 - 441.
- Zhao, Y., Kappes, B., und Franklin, R.M.** (1993). Gene Structure and Expression of an Unusual Protein-Kinase from *Plasmodium-Falciparum* Homologous at Its Carboxyl Terminus with the Ef Hand Calcium-Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 4347-4354.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., und Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621-2632.
- Zinck, R., Cahill, M.A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R.A., und Nordheim, A.** (1995). Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol Cell Biol* **15**, 4930-4938.

Danksagung

Ich danke Tina Romeis für die Möglichkeit, dass ich ungewöhnliche Ideen in einer ungewöhnlichen Arbeitsgruppe umsetzen konnte. Die Diskussionen mit dir haben mir immer geholfen, meine Gedanken zu sortieren, denn meist warst du anderer Meinung, und dann sollte man gut vorbereitet sein.

Michael Bölker danke ich dafür, dass er bereitwillig das Erstgutachten für meine Arbeit übernommen hat und dass er mir immer wieder zeigt, dass Wissenschaftler kein Beruf, sondern Berufung ist.

Ich danke allen Leuten, die mich bei meinen Projekten unterstützt haben: Danke an Thomas Colby für die Methodentüftlerei am Q-TOF und für die Bike-Diskussionen auf Englisch (Now I know what a crank is!). Und ich danke Jürgen Schmidt und Anne Bräutigam für die Hilfe mit den 2D-Gelen, Wolfram Weckwerth und Katja Morgenthal für die Metabolommessungen und die tagelangen Auswertungen, Claudia Oecking für die Zusammenarbeit bei den 14-3-3 Proteinen und Karsten Niefind für die versuchte Kristallisation, auch wenn der Kristall nur für eine Valentinskarte gereicht hat.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Romeis für die gute Atmosphäre im Labor und außerhalb des Labors. Ich glaube unsere Kaffeepausen sind inzwischen legendär und werden in die Geschichte des MPIZ eingehen. Vor allem Gerald danke ich für eine tolle Zeit. Die Zusammenarbeit während der Diplomarbeit hatte mir ja nicht gereicht, und ich hoffe dass wir uns noch oft abends mal auf einen Cocktail treffen werden. Den Parkers danke ich ebenso; ihr wart immer Teil der Arbeitsgruppe, zumal man ja immer zu euch rüber musste, um die eigenen Gelkammern zurückzuholen ;-).

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung. Ich kann immer auf euch zählen und das ist ein wirklich beruhigendes Gefühl. Durch euch habe ich gelernt auf dem Teppich zu bleiben (klappt nicht immer!). Und ich kann auch einen Nagel gerade in die Wand schlagen, was für einen Wissenschaftler schon geradezu außergewöhnlich ist.

Am meisten danke ich Verena, die hier nicht erwähnt werden wollte, weil sie immer wie selbstverständlich für mich da ist. Sie hat mir Halt gegeben, wenn nichts funktioniert hat, und sich mit mir gefreut, wenn es gut lief. Es gibt auch ein Leben neben der Wissenschaft, und das genießen wir in vollen Zügen. Und ich weiß, dass das nicht selbstverständlich ist, und deshalb danke ich dir von ganzem Herzen.

Lebenslauf

Zur Person

Maik Böhmer
Geboren am 14.11.1976 in Hamminkeln, Deutschland
Ledig

Schulbildung

1987 - 1996
Privates Bischöfliches St. Josef Gymnasium, Bocholt,
Abschluss Abitur

Zivildienst

1996 - 1997
Malteser Hilfsdienst, Bocholt
Ausbildung und Tätigkeit als: Rettungssanitäter

Studium und berufliche Tätigkeit

1997 - 2002
Philipps Universität Marburg, Studium der Biologie
Schwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie, Biochemie, Virologie

2001 - 2002
Marburger Förderzentrum für Existenzgründer
Kurs: Innovations- und Führungsmanagement, Entre-/Intra-
preneurship, Marktprozesse, Persönlichkeitsentwicklung

18.09.2002
Diplom
Titel der Diplomarbeit: Suche nach Zielproteinen der Don3-
Proteinkinase aus *Ustilago maydis*

Seit Nov. 2002
Promotion am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln
Titel der Dissertation: Funktionelle Charakterisierung von
AtCPK1 und AtCPK2 aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung
einer chemisch-genetischen Methode

Poster und Publikationen

2002
1st International Ustilago conference, Marburg
Poster: Suche nach Zielproteinen der Don3-Proteinase aus
U. maydis

2003
7th International congress of plant molecular biology, Barcelona
Poster: Identification of NtCDPK2 phosphorylation targets

2004
17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen
Poster: Chemisch-genetische Analyse der Rolle der CDPKs in
der Stressantwort

2004
13th International workshop on plant membrane biology, Montpellier
Poster: Chemical-genetic screen to assess calcium-dependent
protein kinase (CDPK) function in *A. thaliana*.

Böhmer, M., Kurth, J., Witte, C.P., and Romeis, T. (2006). Function of plant Calcium-dependent protein kinases in the activation of abiotic and pathogen-related stress responses and its potential application in the generation of stress-resistant plants. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues (1st Edition)*, J.A. Teixeira da Silva, ed (London, UK: Global Science Books).

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)