

***In vivo*-Untersuchungen von Konformations-Änderungen
der Calcium-abhängigen Protein-Kinase NtCDPK2
aus *Nicotiana tabacum***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Gerald Freymark
aus Mönchengladbach

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 25. Oktober 2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Tina Romeis

Tag der mündlichen Prüfung am 26. Oktober 2005

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	Hz	Hertz = 1/s
ADIS	Automatische DNA-Isolierung und Sequenzierung am MPIZ Köln	kb	Kilobasenpaare
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzen-sulfonyl-fluorid	kDa	Kilodalton
AP	Alkalische Phosphatase	MCS	„Multiple Cloning Site“
APS	Ammoniumperoxodisulfat	min	Minute(n)
AtCPK	CDPK aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	MOPS	3(N-Morpholino)propansulphonat
A. thaliana	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MPIZ Köln	Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln
ATP	Adenosin-Triphosphat	mut	mutierte Version
A. tumefaciens	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N. benthamiana	<i>Nicotiana benthamiana</i>
BCIP	Tetrazolium-5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat	NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“
BiFC	„Bimolecular Fluorescence Complementation“	N. tabacum	<i>Nicotiana tabacum</i>
bp	Basenpaar(e)	N-Terminus	Amino-Terminus
BSA	„Bovine Serum Albumin“	Nub	N-Terminus von Ubiquitin
C-Terminus	Carboxy-Terminus	NYFP	N-Terminus von YFP
CDPK	„Calcium Dependent Protein Kinase“	OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
CFP	„Cyan Fluorescent Protein“	ORF	„Open Reading Frame“
c myc	c myc Proto-Onkogen	O. sativa	<i>Oryza sativa</i>
cPCR	Kolonie-PCR	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Cub	C-Terminus von Ubiquitin	PCR	„Polymerase Chain Reaction“
CYFP	C-Terminus von YFP	PEG	Polyethylenglycol
Dha	DHFR-HA	RNA	Ribonukleinsäure
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase	RNase	Ribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rpm	„rotations per minute“
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“
DMF	Dimethylformamid	SplitUB	„Split Ubiquitin“
DMSO	Dimethylsulfoxid	Tab.	Tabelle
DTT	Dithiothreitol	TAE	Tris/HCl-Acetat-EDTA Puffer
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	TBS	Tris-Borat-Natriumchlorid Puffer
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	TBST	TBS-Puffer + Tween
f.c.	„final concentration“	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
FRET	„Fluorescence Resonance Energy Transfer“	T_m	mittlere Schmelztemperatur
GFP	„Green Fluorescent Protein“	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
h	Stunde(n)	UB	Ubiquitin
HA	Hämagglutinin	ÜNK	Übernacht-Kultur
		wt	Wildtyp
		YFP	„Yellow Fluorescent Protein“
		*	N-terminale Myristoylierungs-Signalsequenz von NtCDPK2

Inhalt

Abkürzungen und Fachbegriffe	I
Inhalt	II
<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Calcium-modulierte Protein-Kinasen	1
1.2 Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs)	4
1.3 NtCDPK2 aus <i>Nicotiana tabacum</i>	8
1.4 Cryptochrome	11
1.5 Protein-Interaktionen und -Konformationen	13
1.5.1 Interaktionsnachweis über das Split-Ubiquitin-System	13
1.5.2 Konformations-Analysen mit dem SplitUB-System	16
1.5.3 „ <i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> “ (BiFC)	18
1.5.4 „ <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> “ (FRET)	19
1.6 Zielsetzung	22
<u>2 Ergebnisse</u>	23
2.1 NtCDPK2 mit mutierter Junction-Domäne	23
2.2 Anwendung des SplitUB-Systems für NtCDPK2-Domänen <i>in trans</i>	26
2.2.1 SplitUB-System in Hefe	26
2.2.2 SplitUB-System <i>in planta</i>	28
2.3 Anwendung des SplitUB-Systems für NtCDPK2 <i>in cis</i>	30
2.3.1 SplitUB-System in Hefe	31
2.3.2 SplitUB-System <i>in planta</i>	34
2.4 Konformationen von AtCRY2 <i>in planta</i>	43
2.5 „<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>“ (BiFC)	45
2.6 Intramolekularer „<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>“ (FRET)	49

3 Diskussion	53
3.1 NtCDPK2 mit mutierter Junction-Domäne	53
3.2 Interaktionen von NtCDPK2-Domänen <i>in trans</i>	55
3.2.1 SplitUB in Hefe, <i>in trans</i>	55
3.2.2 SplitUB <i>in planta, in trans</i>	57
3.3 Konformationen von NtCDPK2, Interaktionen <i>in cis</i>	58
3.3.1 SplitUB in Hefe, <i>in cis</i>	58
3.3.2 SplitUB <i>in planta, in cis</i>	59
3.4 Konformationen von Cryptochrom <i>in planta</i>	63
3.5 Mögliche Optimierungen des SplitUB-Systems <i>in planta</i>	64
3.6 „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC)	65
3.7 Intramolekularer „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET)	67
3.8 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse	68
3.9 Ausblick	70
4 Zusammenfassung	72
5 Material	73
5.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen	73
5.1.1 Mikroorganismen-Stämme	73
5.1.2 Pflanzen	74
5.1.3 Chemikalien und sonstige Materialien	74
5.1.4 Kits	76
5.1.5 Enzyme, Proteine und Antikörper	76
5.2 Puffer und Lösungen	76
5.3 Medien	78
5.3.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	78
5.3.2 Medien zur Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	79
5.3.3 Medien zur Kultivierung von Hefe	79
5.4 Nukleinsäuren	80
5.4.1 Plasmide	80
5.4.2 Oligonukleotid-Primer	81

6 Methoden	83
6.1 Kultivierung von Mikroorganismen	83
6.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	83
6.1.2 Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	83
6.1.3 Kultivierung von Hefe	83
6.2 DNA-Arbeiten	84
6.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	84
6.2.2 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion	84
6.2.3 Zielgerichtete Mutagenese	85
6.2.4 Restriktions-Analyse von DNA	86
6.2.5 Dephosphorylierung von DNA	87
6.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	87
6.2.7 Gateway TM -Klonierungen	87
6.2.8 pGEM [®] -T - Klonierungen	87
6.3 Analyse von DNA	88
6.3.1 DNA-Konzentration	88
6.3.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	88
6.3.3 DNA-Sequenzierung	88
6.4 Plasmid-Konstrukte	89
6.4.1 SplitUB-Konstrukte für Hefe, <i>in trans</i>	89
6.4.3 SplitUB-Konstrukte für Pflanze, <i>in trans</i>	91
6.4.2 SplitUB-Konstrukte für Hefe, <i>in cis</i>	92
6.4.4 SplitUB-Konstrukte für Pflanze, <i>in cis</i>	93
6.4.5 BiFC-Konstrukte	96
6.4.6 FRET-Konstrukte	97
6.5 Transformationen von Mikroorganismen	98
6.5.1 Herstellung chemo-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	98
6.5.2 Transformation von <i>E. coli</i>	98
6.5.3 Herstellung elektro-kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	98
6.5.4 Elektro-Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	99
6.5.5 Hefe-Transformation	99
6.7 Pflanzenarbeiten	99
6.7.1 Anzuchtbedingungen für <i>Nicotiana</i> -Arten	99
6.7.2 Transiente Expression in Pflanzen	100
6.7.3 Trypanblau-Färbung	100
6.7.4 UV-Mikroskopie zum Zelltod-Nachweis	101
6.7.5 Fluoreszenz-Mikroskopie für BiFC	101
6.7.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	101

6.8 Proteinarbeiten	102
6.8.1 Protein-Extrakte aus <i>N. benthamiana</i>	102
6.8.2 Protein-Extrakte aus Hefe	102
6.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	102
6.8.5 Western-Blot und Quantifizierung	103
6.9 Erstellung eines phylogenetischen Baums	105
<u>7 Literatur</u>	106
<u>8 Anhang</u>	115
8.1 Tabellen 9 und 10	115
8.2 Abbildungsverzeichnis	116
8.3 Danksagung	117
8.4 Lebenslauf	118
8.5 Erklärung	120

1 Einleitung

Pflanzen sind sich ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Dabei reagieren sie sowohl auf abiotische Faktoren wie Hitze und Kälte, hohe Salzkonzentrationen oder Nährstoffmangel, als auch auf Trockenheit und unterschiedliche Licht-Intensitäten. Nicht zuletzt auch biotische Faktoren wie ein Pathogenbefall durch Bakterien, Pilze und Viren sowie Verletzungen durch Fraßfeinde lösen schon auf zellulärer Ebene eine Stress-Antwort aus. Nach der Perzeption dieser Stress-Stimuli über entsprechende Rezeptor-Proteine erfolgt eine Weiterleitung des Signals über Transduktions-Wege und -Netzwerke. Im Endeffekt kann somit über die Veränderung der Aktivität von Enzymen und die Expression von Genen eine systemische Stress-Antwort induziert werden, um letztendlich die Pflanze den neuen Gegebenheiten anzupassen.

1.1 Calcium-modulierte Protein-Kinasen

Viele Stress-Arten lösen bei Pflanzen ein Einströmen von Calcium aus dem Apoplasten in das Cytosol aus oder führen zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus internen Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum und der Vakuole. Hierfür sind unterschiedliche Proteine von Bedeutung, die entweder als Transporter die Calcium-Ionen aktiv oder als Kanäle passiv in die entsprechenden zellulären Kompartimente gelangen lassen. So wurden nach der Entschlüsselung des Genoms der dikotylen Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana* insgesamt 77 potentielle Calcium-Pumpen und Kanäle für diesen Organismus vorhergesagt (Harper und Harmon, 2005), darunter auch der erst kürzlich näher charakterisierte, Ca^{2+} -abhängige TPC1-Kanal (Peiter *et al.*, 2005). Die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann zu einem transienten Konzentrations-Anstieg oder vielfach auch zu einer Oszillation führen (Sanders *et al.*, 2002). Der Mechanismus, der solche Oszillationen verursacht, ist bislang unklar. Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können von verschiedenen Arten von Calcium-Sensoren perzipiert und in Signale umgewandelt werden. Für *A. thaliana* wurden über 400 dieser für die Erkennung des Calcium-Signals verantwortlichen, Ca^{2+} -bindenden Proteine vorhergesagt (Harper und Harmon, 2005). Neben diesen spielen auch Protein-Kinasen in der anschließenden Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Letztere können entweder selbst Calcium durch spezifische Domänen chelatisieren oder mit Ca^{2+} -bindenden Proteinen interagieren. Nach Aktivierung können die Kinasen Substrate wie z.B. andere Proteine phosphorylieren und so deren Aktivität, Funktion oder auch Stabilität gegenüber spezifischem Abbau beeinflussen (Poovaiah und Reddy, 1993; Sessa und Martin, 2000; Romeis, 2001).

In Pflanzen sind direkte Homologe zu den tierischen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in der Zellmembran bislang nicht gefunden worden. Lediglich zwei analoge, in der Calcium-

Perzeption involvierte Rezeptoren sind bislang nachgewiesen. So kann Phototropin, ein in Pflanzen einzigartiger Blaulicht-Rezeptor mit integrierter Kinase-Domäne, spannungsabhängige Calcium-Kanäle in der äußeren Zellmembran aktivieren (Stoelzle *et al.*, 2003). Außerdem wurde in *A. thaliana* der Calcium-Sensor CAS („*Calcium-sensing receptor*“) als hauptverantwortlicher Rezeptor für die Detektion eines Ca^{2+} -Einstroms aus dem Apoplasten vermutet (Han *et al.*, 2003).

Neben diesen Membran-gebundenen Rezeptoren sind in Pflanzen mehrere Klassen von Kinasen bekannt, die innerhalb der Zelle bei der Entschlüsselung der Calcium-Signale beteiligt sind (Hardie, 1999; Harper *et al.*, 2004). Eine große Gruppe bilden darin die Calcium-abhängigen Protein-Kinasen („*Calcium-dependent protein kinases*“, CDPKs). Sie wurden u.a. mit Mitogen Aktivierten Protein-Kinasen (MAPKs) und „*Cell Division Control Proteins*“ (CDCs) der Untergruppe der nicht-transmembranen Protein-Kinasen zugeordnet (s. Abb. 1).

Klasse 1 - Transmembrane Rezeptor-Kinasen und verwandte nicht-transmembrane Kinasen Klasse 2 - ATN1/CTR1/EDR1/GmPK6-ähnliche Kinasen Klasse 3 - Casein Kinasen I Klasse 4 - Nicht-transmembrane Protein-Kinasen Gruppe 4.1 - Mitogen Aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinasen (MAP3K) Gruppe 4.2 - Calcium-„Response“ Kinasen Familie 4.2.1 - Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPK) Familie 4.2.2 - Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Kinasen (PPCK) Familie 4.2.3 - Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasen (CCaMK) Familie 4.2.4 - SNF1-verwandte Protein-Kinasen (SnRK) Familie 4.2.5 - Protein-Kinasen unbekannter Funktion Familie 4.2.6 - IRE/NPH/Phospho-Inositid-abhängige/Ribosomale Protein-S6-Kinasen Familie 4.2.7 - ELM1/PAK1/TOS3-ähnliche Protein-Kinasen Gruppe 4.3 - Protein-Kinasen unbekannter Funktion Gruppe 4.4 - Protein-Kinasen unbekannter Funktion Gruppe 4.5 - MAPK/CDC/CK2/GSK-Kinasen Klasse 5 - Andere und nicht-klassifizierte Protein-Kinasen

Abb. 1: Protein-Kinasen aus Pflanzen. 1264 bekannte Kinasen aus Pflanzen wurden anhand von Sequenzvergleichen in Klassen, Gruppen und Familien eingeordnet. Die Einordnung der CDPKs ist fett gedruckt (nach: <http://plantsp.genomics.purdue.edu/plantsp/family/class.html>).

In der gemeinsamen, modularen Struktur von CDPKs liegen Sensor, die Ca^{2+} -Bindedomäne (CLD), und Effektor, die Kinase-Domäne (K), in einem einzigen Molekül vor (s. Abb. 2; Harmon *et al.*, 2000). Aufgrund seiner großen Homologie mit dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin wird der Sensor als „Calmodulin-ähnliche Domäne“ bezeichnet („*Calmodulin-like domain*“, CLD). Ein in der Literatur diskutiertes Modell besagt, dass eine K und CLD verbindende Domäne („*Junction*“-Domäne, J) als Autoinhibitor dient (Harper *et al.*, 1991; Roberts und Harmon, 1992). Am N-Terminus der CDPK befindet sich ein in seiner Länge und Sequenz wenig konservierter Bereich, die so genannte Variable Domäne (V). Hier finden sich häufig Peptidsequenzen, die zu einer Myristoylierung oder

Palmitoylierung des Moleküls führen und folglich die CDPK in verschiedenen Membranen verankern. Auch am C-Terminus gibt es eine kurze, nicht konservierte Peptidsequenz.

Zwei im modularen Aufbau den CDPKs sehr ähnliche Kinase-Familien aus Pflanzen bilden die chimären Calcium- und Calmodulin-abhängigen Kinasen (CCaMKs) sowie die CDPK-verwandten Kinasen („*CDPK-related kinases*“, CRKs; s. Abb. 2). Im Gegensatz zu CDPKs mit vier EF-Händen zeigen CCaMKs in ihrer Calcium-bindenden Domäne mit drei EF-Händen eher Homologien zu Visinin, einem neuronalen Calcium-Sensor von Vertebraten (Yamagata *et al.*, 1990). Es wird vermutet, dass CCaMKs einerseits direkt durch Ca^{2+} -Ionen, andererseits auch durch eine Bindung von Calmodulin an die Junction-Domäne beeinflusst werden. Hingegen sind bei CRKs die EF-Hände derart modifiziert, dass eine Calcium-Chelatisierung als unwahrscheinlich gilt und die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung durch eine Calmodulin-Bindung verursacht wird (Zhang und Lu, 2003; Hua *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004).

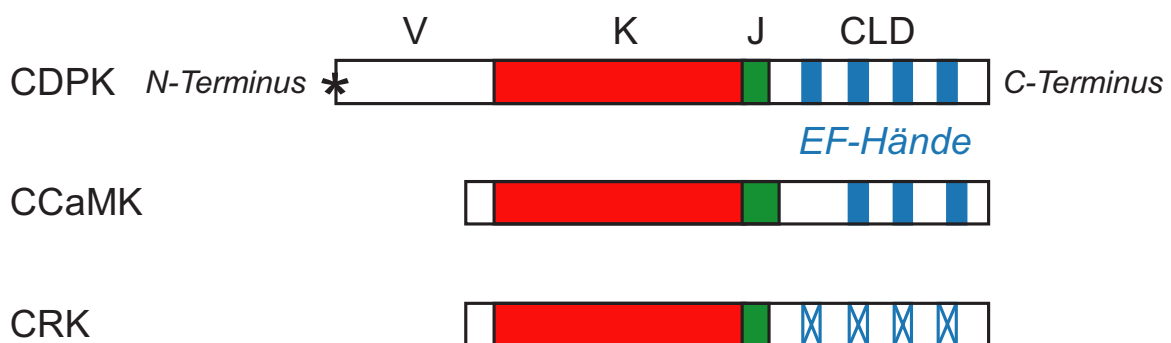


Abb. 2: Konservierter, modularer Aufbau von CDPKs, CCaMKs und CRKs. \star = N-terminale Myristoylierung vieler CDPKs; V = Variable Domäne; K = Kinase-Domäne (rot); J = autoinhibitorische Junction-Domäne (grün); CLD = Calmodulin-ähnliche Domäne; blaue Boxen = EF-Hände; blau-durchgestrichene Boxen = nicht-funktionelle EF-Hände der CRKs. (nach Freymark *et al.*, in Vorbereitung; Harper und Harmon, 2005)

Eine weitere Klasse von Calcium-Sensoren stellen die Calcineurin B - ähnlichen Proteine („*Calcineurin B - like*“, CBL) dar. Sie weisen große Homologien zur regulatorischen Untereinheit B des Calcineurins aus Tieren auf und können Ca^{2+} -Ionen über vier EF-Hände binden (Kudla *et al.*, 1999). Letztere sind jedoch bei den jeweils zehn in *A. thaliana* und in Reis (*Oryza sativa*) gefundenen CBLs häufig degeneriert, wodurch die Calcium-Affinität verringert oder aufgehoben wird (Kolukisaoglu *et al.*, 2004).

CBLs interagieren mit einer Gruppe von Serin/Threonin-Proteinkinasen, den sogenannten „*CBL interacting protein kinases*“ (CIPKs; Shi *et al.*, 1999). Auch diese bilden in *A. thaliana* und *O. sativa* größere Genfamilien mit 25 bzw. 30 Isoformen. Es wird postuliert, dass je nach Art eines Stimulus und folgendem Ca^{2+} -Konzentrations-Anstieg die CBLs Calcium

komplexieren und anschließend mit spezifischen CIPKs interagieren können. Die vielfältigen Interaktions-Möglichkeiten zwischen CBLs und CIPKs lassen ein komplexes Signaltransduktions-Netzwerk vermuten (Kolukisaoglu *et al.*, 2004).

Wie CBLs, CCaMKs und CDPKs besitzen mehr als die Hälfte der in *A. thaliana* vorhergesagten Calcium-bindenden Proteine so genannte EF-Hände. Die Bezeichnung stammt aus der Röntgen-Strukturanalyse des Muskelproteins Parvalbumin, welches insgesamt vier solcher Domänen besitzt (Kretsing und Nockolds, 1973). In der zwei antiparallel angeordnete α -Helices verbindenden Schleife kann ein Ca^{2+} -Ion komplexiert werden (s. Abb. 3). Die Röntgen-Struktur der von den mit E und F bezeichneten Helices flankierten zweiten Bindestelle in Parvalbumin erinnert an eine greifende Hand, weshalb der Begriff EF-Hand geprägt wurde. Derartige Bindestellen weisen eine hohe Spezifität für Calcium-Ionen auf (Kroeker, 1994).

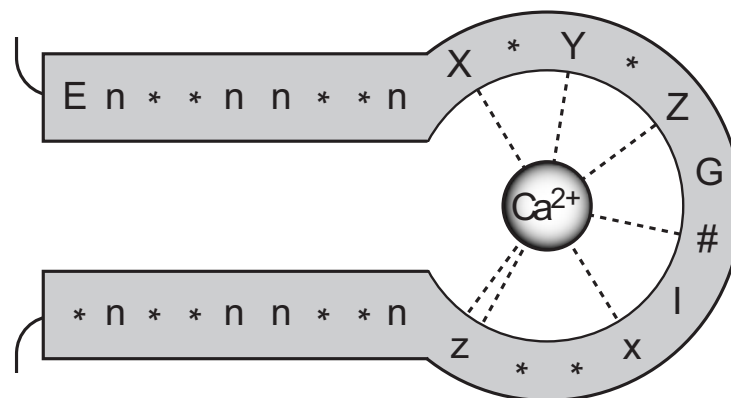


Abb. 3: Modell des EF-Hand-Aufbaus. Basierend auf der Konsensus-Sequenz und anhand von Struktur-Analysen erstelltes Modell von EF-Händen. Die waagerechten Balken rechts stellen α -Helices dar, die linke Schleife chelatisiert Ca^{2+} (gezeigt als gestrichelte Linien). E = Glutamat, in CDPKs jedoch meist nur in EF-Hand #2 zu finden; * = beliebige Aminosäure; n = hydrophobe Aminosäuren der α -Helices; X = erster Calcium-Ligand; Y = zweiter Ligand; Z = dritter Ligand; G = Glycin; # = vierter Ligand, durch Carbonyl-Gruppe einer Peptidbindung; I = Isoleucin, z.T. auch andere aliphatische Aminosäuren; x = fünfter Ligand; z = bidentater Ligand, meist Glutamat, seltener Aspartat (nach M. Nelson: „*The EF-Hand Calcium-Binding Proteins Data Library*“, http://structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/seq/individ.aa/index.html).

1.2 Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs)

CDPKs sind ausschließlich bei Pflanzen und wenigen Protisten wie dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* zu finden. Auch bei *Plasmodium berghei*, einem verwandten Nager-Pathogen, konnte eine für die Gametogenese verantwortliche CDPK gefunden werden,

welche daher u.a. ein geeignetes Zielprotein für die Entwicklung von Medikamenten gegen Malaria und andere durch Plasmodien verursachte Krankheiten darstellen könnte (Billker *et al.*, 2004).

Genomanalysen zeigen, dass CDPKs in Pflanzen große Gen-Familien bilden: Insgesamt 29 Isoformen wurden im monokotylen Reis gefunden (Asano *et al.*, 2005), 34 in der dikotylen Pflanze *A. thaliana* (s. Abb. 4). Obwohl für viele Isoformen die biologische Funktion noch unbekannt ist, konnte für einige Enzyme eine Rolle in der Signaltransduktion nachgewiesen werden. So ist eine biochemische Aktivierung nach abiotischen Stimuli wie Kälte (Martin und Busconi, 2001) oder osmotischem Stress (NtCDPK2 aus Tabak, *Nicotiana tabacum*; Romeis *et al.*, 2001) nachgewiesen. Zudem werden viele CDPKs auch transkriptionell durch Kälte (z.B. MsCK1, MsCK2 aus Alfalfa (*Medicago sativa*); Monroy und Dhindsa, 1995) oder Verwundung (z.B. NtCDPK1; Yoon *et al.*, 1999) aktiviert, aber auch nach Salzstress und Trockenheit (z.B. AtCPK10 und AtCPK11 aus *A. thaliana*; Urao *et al.*, 1994) oder hypo-osmotischem Stress (z.B. NtCDPK2 und NtCDPK3; Romeis *et al.*, 2001). Ebenso konnte für das Reis-Enzym OsCDPK2 gezeigt werden, dass eine zwölfstündige Bestrahlung mit Weißlicht zu einer Reduktion der Transkripte führt (Breviario *et al.*, 1995). Ähnliches gilt für ZmCPK7 und ZmCPK9 aus Mais (*Zea mays*), die in etiolierten Blättern stärker als in grünen Blättern exprimiert sind (Saijo *et al.*, 1997). Eine umfassende Übersicht der Involvierung von CDPKs in verschiedenen Stress-Antworten lieferten Ludwig *et al.* (Ludwig *et al.*, 2004).

Durch eine Überexpression der in den Stress-Antworten involvierten CDPKs konnte in einigen Experimenten eine erhöhte Resistenz gegenüber Stress-Faktoren erreicht werden. OsCDPK7 aus Reis wird z.B. nach Salzstress transkriptionell aktiviert. Die Überexpression resultiert in einer gesteigerten Kälte-, Salz- und Trockenheits-Toleranz (Saijo *et al.*, 2000). Entsprechend verursachte ein Gen-„Silencing“ durch RNA-Interferenz (RNAi) eine Verringerung in den oben genannten Stress-Toleranzen (Saijo *et al.*, 2000). Auch biotische Faktoren aktivieren vielfach CDPKs. Am besten untersucht sind hier Pflanze-Pathogen-Interaktionen mit Pilzen. Für ZmCPK10 aus Mais konnte z.B. eine Aktivierung nach Infektion durch Sporen von *Fusarium moniliforme* oder dessen Elizitoren gezeigt werden (Murillo *et al.*, 2001). Vielfach ist auch eine Aktivierung durch unterschiedliche, sowohl biotische als auch abiotische Faktoren möglich. NtCDPK1 aus Tabak wird durch biotische Stimuli wie pilzliche Elizitoren oder Chitosan, durch Pflanzenhormone wie Giberillin-Säure (GA), Abszisin-Säure (ABA), Cytokinin und Methyl-Jasmonsäure aber auch durch abiotische Faktoren wie Salz-Stress oder Verwundung transkriptionell aktiviert (Yoon *et al.*, 1999).

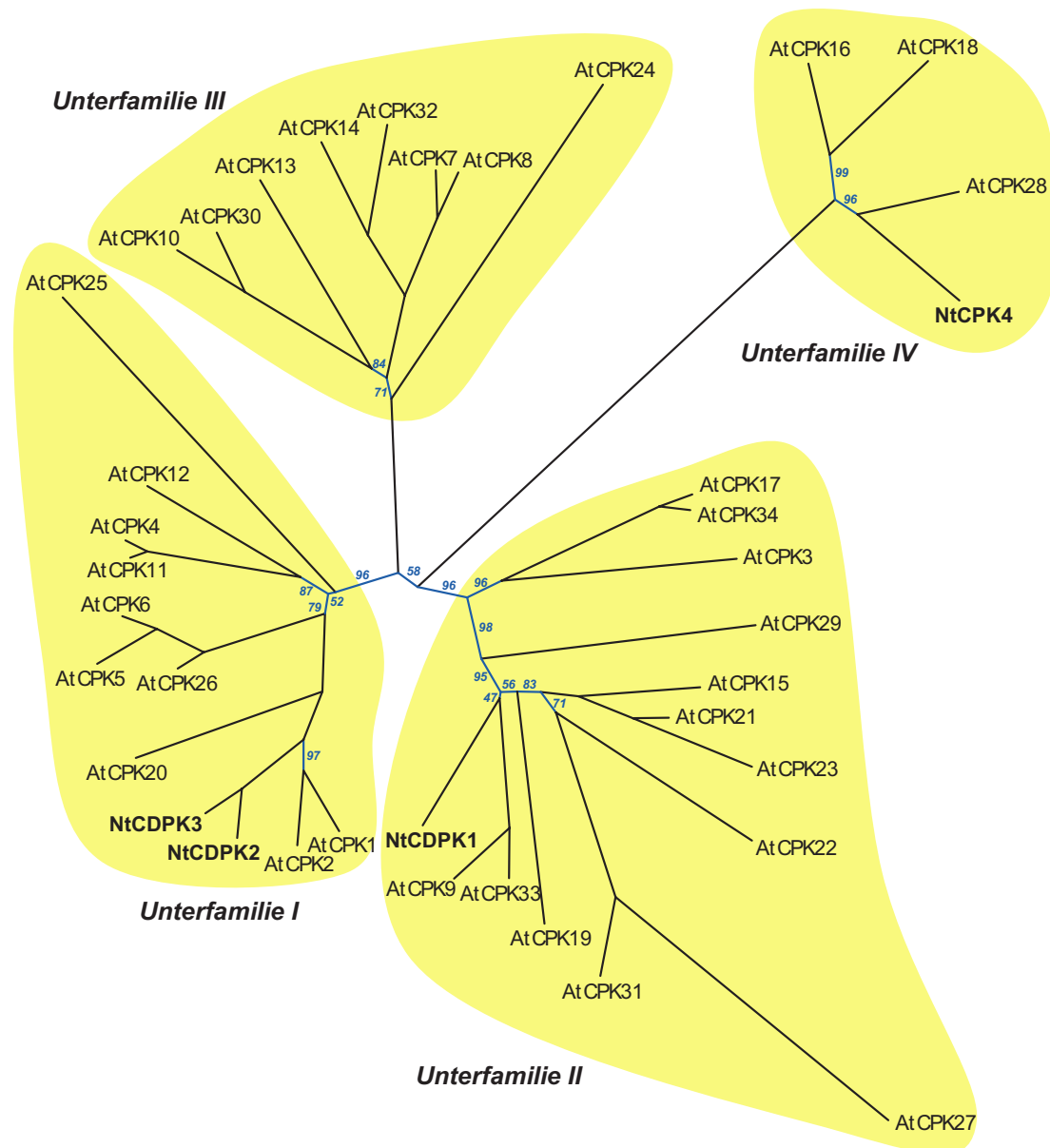


Abb. 4: Phylogenetischer Baum von CDPKs. Anhand der vollständigen Aminosäuresequenzen aller CDPKs von *A. thaliana* mit „PHYLIP“-Programmen erstellter phylogenetischer Baum (s. Methoden 6.9). Die Unterfamilien sind gelb hinterlegt. Bekannte CDPKs von *N. tabacum* wurden integriert (fett gedruckt). „Bootstrap“-Werte ungleich 100% und die zugehörigen Äste sind in blau angegeben.

Ein Modell für den Aktivierungs-Mechanismus von CDPKs, welches *in vitro*- und *in vivo*-Daten vereinigt (Romeis *et al.*, 2001; Freymark *et al.*, in Vorbereitung) und auf einem Modell von Yoo *et al.* basiert (Yoo und Harmon, 1996), postuliert einen inaktiven Zustand des Enzyms, in dem die Junction-Domäne aufgrund ihrer Eigenschaft als Pseudo-Substrat an das Aktive Zentrum der Kinase bindet und damit ihre Aktivität hemmt (s. Abb. 5). Nach einem Stress-Stimulus und dem darauf folgenden Ca^{2+} -Einstrom wird Calcium von der CLD gebunden, welche daraufhin mit J interagiert und sie aus dem Aktiven Zentrum der Kinase ziehen kann. Die auf diese Weise aktivierte Kinase kann nun in der Signaltransduktions-Kette folgende Zielproteine phosphorylieren und das Signal damit weiterleiten.

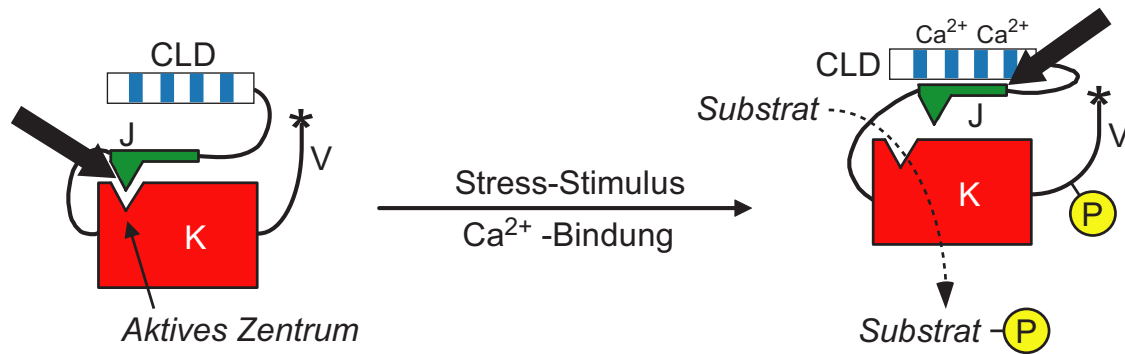


Abb. 5: Aktivierungs-Modell von CDPKs. Veränderungen intramolekularer Domänen-Interaktionen nach Stress-Stimulus und Calcium-Bindung ermöglichen den Übergang der CDPK aus einer Ruhe-Form (links) zu einer aktivierten Form (rechts), in welcher mögliche Substrate und das Enzym selbst phosphoryliert werden können. ★ = N-terminale Myristoylierung; V = Variable Domäne; K = Kinase-Domäne (rot); J = autoinhibitorische Junction-Domäne (grün); CLD = Calmodulin-ähnliche Domäne; blaue Boxen = EF-Hände; ➔ = postulierte Interaktionen im inaktiven Zustand (links) von J und K oder im aktivierten Zustand (rechts) zwischen J und CLD; ⊕ = Phosphat-Gruppe (nach Freymark *et al.*, in Vorbereitung).

Eine Bindung zwischen Kinase- und Junction-Domäne konnte bereits beim rekombinanten Arabidopsis-Enzym AtCPK1 (Harper *et al.*, 1994) und bei der CDPK α aus Sojabohne (*Glycine max*; Harmon *et al.*, 1994) gezeigt werden. Ebenso wurde eine Interaktion von J und CLD in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration demonstriert (Huang *et al.*, 1996; Vitart *et al.*, 2000). Bisherige Untersuchungen beschränkten sich jedoch auf *in vitro*-Interaktionen zwischen isolierten Peptiden und wurden *in vivo* bislang nicht durchgeführt.

Außerdem sind in der Literatur von vollständigen CDPKs keine Struktur-Analysen beschrieben, die einen Vergleich mit dem Modell zuließen. Publierte Untersuchungen beschränkten sich auf Analysen der CLD (Weljie *et al.*, 2004; Weljie und Vogel, 2004), Experimente zur Kristallisation von AtCPK1 und NtCDPK2 waren erfolglos (persönliche Auskunft Prof. J. F. Harper Ph.D., University of Nevada, Reno, USA; M. Böhmer, MPIZ, Köln).

Als CDPK-Substrate wurden bislang nur wenige Ziel-Proteine charakterisiert. So konnte für die 1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxylat Synthase LeACS2, einem Enzym der Ethylen-Biosynthese aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), eine Phosphorylierung durch verschiedene CDPKs, u.a. LeCDPK2 gezeigt werden (Fukaya und Mori, 2003; Mori *et al.*, 2003; Sebastia *et al.*, 2004). Diese Phosphorylierung führt zu einer Stabilisierung der LeACS2 gegenüber spezifischem Abbau und geschieht unmittelbar nach deren Translation (Tatsuki und Mori, 2001). Des Weiteren konnten Allwood *et al.* zeigen, dass der durch eine CDPK phosphorylierte Actin-Depolymerisations-Faktor ZmADF3 aus Mais inaktiv im Vergleich mit der nicht-phosphorylierten Form ist (Allwood *et al.*, 2001).

Bei der Suche nach neuen Zielproteinen wurden vielfach auch kurze Peptide als künstliche Substrate verwendet (Huang *et al.*, 2001; Huang und Huber, 2001). Aus solchen Studien und

Vergleichen mit bekannten Protein-Substraten (Neumann *et al.*, 1996; Loog *et al.*, 2000) konnten mehrere Sequenz-Motive gefunden werden, die als Ziel für eine CDPK-Phosphorylierung dienen können. Eine Übersicht ist in einem kürzlich erschienenen Review zu finden (Harper und Harmon, 2005). Zudem zeigen sich diese Motive auch in der auto-inhibitorischen Junction-Domäne verschiedener CDPKs und könnten ihre Funktion als Pseudo-Substrat erklären. Die größtenteils auf *in vitro*-Daten mit kleineren Peptiden basierenden Motive stimmen jedoch nicht immer mit *in vivo* gefundenen Phosphorylierungen überein. Dies wurde am Beispiel von NtCDPK2 gezeigt, welche an Serin 18 phosphoryliert ist, jedoch in dieser Region keinerlei Übereinstimmungen mit oben genannten Motiven aufweist (Glinski *et al.*, 2003). Aber auch Vorhersagen von Phosphorylierungs-Stellen sind schwierig, da in eindeutig übereinstimmenden Sequenzen verschiedener CDPKs wiederum keine Phosphorylierungen gefunden werden konnten (persönliche Auskunft M. Böhmer, MPIZ, Köln).

Neben den Phosphorylierungen von Substraten kommt es nach Aktivierung von CDPKs auch zu Auto-Phosphorylierungen, für die eine zentrale Rolle in der Regulation postuliert wird. Diese Reaktion kann u.a. für die Bindung von 14-3-3 Proteinen wichtig sein, die durch die Interaktion zu weiteren Proteinen die Lokalisation der CDPKs und deren Enzym-Aktivität steuern können. In diesem Zusammenhang konnten nach Expression in *Escherichia coli* Auto-Phosphorylierungen bei AtCPK1 innerhalb von Aminosäuresequenz-Motiven gefunden werden, für die eine mögliche Interaktion mit 14-3-3 Proteinen vorhergesagt ist (persönliche Auskunft M. Böhmer, MPIZ, Köln; Hegeman *et al.*, 2004). In der Literatur ist eine solche Auto-Phosphorylierung *in planta* bislang nur am Beispiel von NtCDPK2 beschrieben (Glinski *et al.*, 2003).

1.3 NtCDPK2 aus *Nicotiana tabacum*

Die Isoform NtCDPK2 aus *N. tabacum* stellt einen typischen Vertreter der CDPKs dar. Sie weist die modulare Struktur mit einer 116 Aminosäuren langen Variablen Domäne inklusive der möglichen Myristoylierungs-Sequenz M-G-N-T-C-V auf (s. Abb. 6). Die Kinase-Domäne zeigt alle zwölf für Protein-Kinasen typischen Motive (Hanks und Hunter, 1995; Chico *et al.*, 2002), einschließlich der Sequenz G-X-G-X-X-G-X-V (X = beliebige Aminosäure) zur ATP-Bindung in Domäne I und dem für den Phosphat-Transfer nötigen Lysin an Position 146 in Domäne II. Das für die Serin/Threonin-Spezifität wichtige Motiv H-R-D-L-K-P-E-N mit der katalytischen Aminosäure Aspartat (D241) ist in Domäne VIb zu finden, ebenso wie der Konsensus für Serin/Threonin-Kinasen G^T/_S-X-X^Y/_F-X-A-P-E in Domäne VIII. Auf die sich anschließende Junction-Domäne folgen vier wahrscheinlich funktionelle EF-Hände in der CLD, welche wie andere CDPKs bis auf das N-terminale Glutamat der ersten α -Helix mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmen (s. Abb. 3, Abb. 6).

NtCDPK2 wurde erstmals nach einem Pathogen-verwandten Stimulus und damit einhergehender Gen-für-Gen-Interaktion aufgefunden. So wurde bei Expression des Resistenz-Gens *Cf-9* aus Tomate in Tabak und Injektion des zugehörigen Elicitors Avr9 aus *Cladosporium fulvum* eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität („*shift in electrophoretic mobility*“, Shift) von NtCDPK2 und NtCDPK3 beobachtet (Romeis *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Shift in NtCDPK2 durch Phosphorylierungen an zwei distinkten Aminosäuren verursacht wird (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Der Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität zur inaktiven Form ist jedoch deutlich größer als es rechnerisch durch die Addition zweier Phosphatgruppen der Fall sein könnte. Des Weiteren konnten für diese Aminosäuren sowohl eine Auto-Phosphorylierung als auch eine Phosphorylierung durch eine andere Kinase gezeigt werden, die bei besserer Auflösung in einer SDS-PAGE zwei distinkte, sich addierende Shifts von NtCDPK2 aufzeigen (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Auch ein hypo-osmotischer Schock verursachte diese Shifts, die damit einhergehende Aktivierung der Kinase sowie eine anschließende transkriptionelle Aktivierung des entsprechenden Gens. NtCDPK2 ist daher sowohl bei biotischen als auch abiotischen Stress-Antworten involviert (s. Abb. 7).

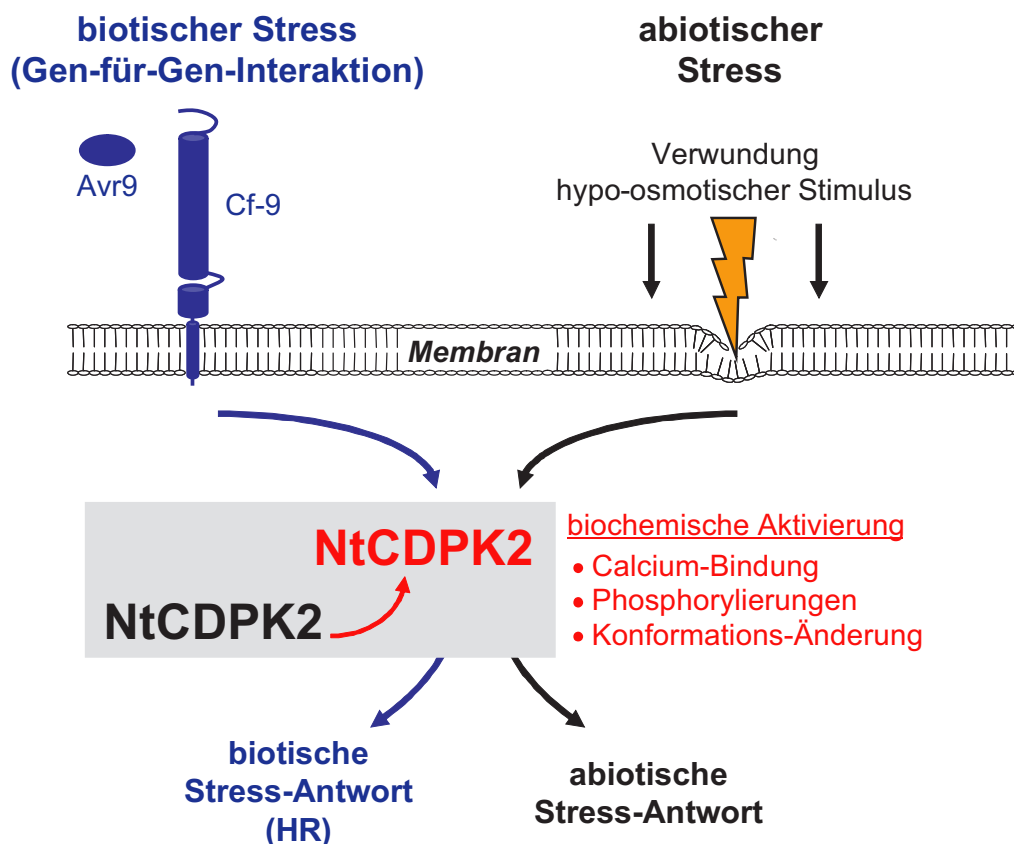


Abb. 7: Involvierung von NtCDPK2 in der Signaltransduktion. Sowohl nach biotischem (links) als auch abiotischem Stress (rechts) wird NtCDPK2 aktiviert (rot), welches mit verschiedenen post-translationalen Modifikationen einhergeht. Die Weiterleitung der Signale bedingt sowohl biotische Antworten wie eine „*Hypersensitive Response*“ (HR) als auch abiotische Reaktionen der Pflanze.

Dieser Shift konnte schon bei verschiedenen Enzymen nach Aktivierung beobachtet werden. Auch für das Cryptochrom AtCRY2, einem Blaulichtrezeptor aus *A. thaliana*, ist eine solche elektrophoretische Mobilitäts-Änderung nach Bestrahlung mit Blaulicht beschrieben worden (Müller *et al.*, 2003).

Das Entfernen der regulatorischen Domänen von NtCDPK2 und die damit einhergehende Verkürzung des Proteins auf die Variable und Kinase-Domäne resultiert in einer deregulierten Kinase. Diese kann bei transienter Überexpression in *Nicotiana benthamiana* nach einem adäquaten, milden Stress-Stimulus wie der Injektion von Wasser in die exprimierenden Blätter eine relativ starke Stress-Antwort verursachen (Romeis *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2005). Diese Reaktion ähnelte einer „*Hypersensitive Response*“ (HR), welche eine Form des programmierten Zelltods als Reaktion auf die Gen-für-Gen-Interaktion zwischen Cf-9 und Avr9 darstellt.

Der beschriebene Phänotyp kann durch die Koexpression der Junction-Domäne blockiert werden. Hingegen verhindert eine in drei konservierten Aminosäuren mutierte Version dieser Domäne die HR nicht, da jene nicht mehr als Pseudo-Substrat erkannt werden kann (T. Romeis, unveröffentlicht).

1.4 Cryptochrome

Wie für NtCDPK2 wird auch für den UV-A- und Blaulicht-Rezeptor Cryptochrom eine Stimulus- und Aktivitäts-abhängige Konformations-Änderung postuliert (Yang *et al.*, 2000). Dieser bildet neben den Phytochromen für rotes und dunkelrotes Licht sowie den Phototropinen für blaues und UV-Licht die dritte Klasse pflanzlicher Photorezeptoren (Chen *et al.*, 2004). Das erste pflanzliche Cryptochrom-Gen konnten Ahmad *et al.* nach Analyse der bereits näher charakterisierten *Arabidopsis*-Photomorphogenese-Mutante *hy4* klonieren (Koornneef *et al.*, 1980; Ahmad und Cashmore, 1993). Diese Gene sind auch bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*; Emery *et al.*, 1998) und beim Menschen (*Homo sapiens*; Todo *et al.*, 1996) sowie den Prokaryoten *Synechocystis* (Kleine *et al.*, 2003) und dem Human-Pathogen *Vibrio cholerae* (Worthington *et al.*, 2003) gefunden worden.

Cryptochrome zeigen eine hohe Sequenz-Homologie zu Photolyasen, die unter Lichteinwirkung durch UV-Licht verursachte DNA-Schäden reparieren können (Sancar, 2000). Ebenso enthalten sie die für die Bindung der Chromophore Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Methenyl-Tetra-Hydro-Folat (MTHF) konservierten Motive. Im Gegensatz zu den Photolyasen weisen jedoch Cryptochrome selbst keine Photolyase-Aktivität auf und besitzen einen verlängerten, wenig konservierten C-Terminus, der nur geringe Sequenz-Homologien zu anderen Proteinen aufweist.

In Pflanzen sind Cryptochrome in der Blaulicht-abhängigen De-Etiolierung wie der Inhibition des Hypokotyl-Längenwachstums und der Öffnung des Hypokotyl-Hakens involviert (Koornneef *et al.*, 1980; Neff und Chory, 1998). Auch eine Rolle der Cryptochrome in der circadianen Rhythmik wurde für *A. thaliana* (Somers *et al.*, 1998) und *D. melanogaster* (Rosato *et al.*, 2001) nachgewiesen.

Eine Kristall-Struktur von Cryptochromen ist bislang nicht publiziert, lediglich ein Modell des N-Terminus wurde anhand der bekannten Struktur der *E. coli*-Photolyase erstellt (Lin und Shalitin, 2003). Allerdings sind kürzlich auch NMR-Strukturdaten des C-Terminus publiziert worden (Partch *et al.*, 2005). Ein von Yang *et al.* aufgestelltes Aktivierungs-Modell (Yang *et al.*, 2000) geht davon aus, dass die Perzeption von blauem und UV-Licht in der N-terminalen, Photolyase-ähnlichen Domäne des Cryptochroms zu einer intra-molekularen Redox-Reaktion führt, welche eine Veränderung des Redox-Zustands des C-Terminus und eine damit einhergehende Konformations-Änderung verursacht (s. Abb. 8). Diese Konformations-Änderung soll letztendlich eine Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen.

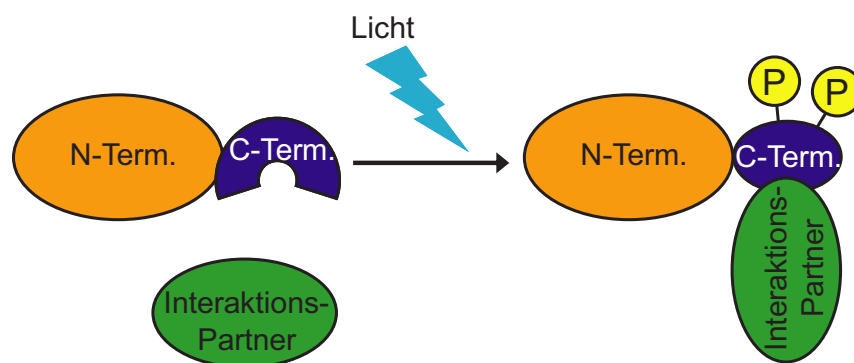


Abb. 8: Aktivierungs-Modell für Cryptochrom. Durch eine Lichtperzeption im N-Terminus des Cryptochroms (N-Term) kommt es durch eine intra-molekulare Redox-Reaktion zu einer Konformations-Änderung im C-Terminus (C-Term), welcher daraufhin mit einem möglichen Zielprotein interagieren kann. Ⓟ = Phosphat-Gruppe.

Neben der Stimulus-abhängigen Konformations-Änderung weisen Cryptochrome weitere Parallelen zu CDPKs auf. So konnten in den Cryptochromen AtCRY1 und AtCRY2 aus *A. thaliana* sowie dem menschlichen HsCRY1 Phosphorylierungen nachgewiesen werden, die einen Shift in der elektrophoretischen Mobilität bedingen (Bouly *et al.*, 2003; Müller, 2003; Müller *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierungen werden sowohl durch andere Enzyme (Ahmad *et al.*, 1998) als auch durch Auto-Phosphorylierung (Bouly *et al.*, 2003) verursacht. Folglich stellen Cryptochrome ein den CDPKs verwandtes System dar, da beide nach definiertem Stimulus eine Konformations-Änderung vollziehen, die mit einer Phosphorylierung einhergeht.

1.5 Protein-Interaktionen und -Konformationen

Wechselwirkungen von Proteinen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von biochemischen Prozessen und in Signal-Transduktionen einer Zelle. Daher ist das Identifizieren möglicher Interaktionen eines Proteins von essentieller Bedeutung, um aufgrund der gefundenen Interaktions-Partner z.B. Aussagen über eine mögliche Funktion treffen zu können. Hierzu werden klassischerweise biochemische Methoden wie die Isolierung von Proteinen und Ko-Immünpräzipitation von Protein-Komplexen angewandt. Diese Methoden erfordern jedoch eine aufwändige Optimierung der Reinigungs-Bedingungen für jede einzelne Untersuchung.

Eine andere Möglichkeit, Interaktionen in großem Maßstab zu analysieren, bilden genetische Selektions-Methoden. Hierbei können ganze Genome auf mögliche Interaktions-Kandidaten eines Proteins durchsucht werden. Auf diese Weise wurden bereits diverse Systeme in verschiedenen Organismen entwickelt, vielfach auch in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Dieser Einzeller eignet sich im Gegensatz zu bakteriellen Systemen besonders für die Analyse von Interaktionen eukaryotischer Proteine. Eines der am häufigsten angewandten, genetischen Selektions-Verfahren stellt das Hefe-Zwei-Hybrid System dar („*yeast two hybrid*“, Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Hierbei wird ein Teil eines Transkriptions-Faktors an das zu untersuchende Protein fusioniert, die andere Hälfte an eine Sammlung von Proteinen z.B. aus einer cDNA-Bank. Erst nach erfolgreicher Interaktion *in vivo* und Rekonstitution des Transkriptions-Faktors können Marker-Gene exprimiert werden, auf welche anschließend selektiert wird. Ein Nachteil dieser Methode liegt allerdings darin, dass eine Interaktion im Zellkern zustande kommen muss. Ist hingegen eines der Proteine Membran-lokalisiert, wie z.B. durch eine Transmembran-Domäne oder eine Myristoylierung, ist das Hefe-Zwei-Hybrid System weniger günstig. Das „*reverse Ras recruitment system*“ (Broder *et al.*, 1998) oder die G-Protein Fusions-Technologie (Ehrhard *et al.*, 2000) sind Alternativen, die gerade für die Untersuchung von Membran-Proteinen entwickelt wurden.

1.5.1 Interaktionsnachweis über das Split-Ubiquitin-System

Neben bereits genannten Methoden können Protein-Interaktionen mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems (SplitUB) nachgewiesen werden (Johnsson und Varshavsky, 1994). Diese ebenfalls in Hefe etablierte Methode basiert auf der Rekonstitution zweier Hälften des bei Eukaryoten hoch konservierten Ubiquitins (UB), welches aus nur 76 Aminosäuren besteht und eine essentielle Rolle bei der gezielten Degradation von Proteinen über das 26S-Proteasom spielt (s. Abb. 9).

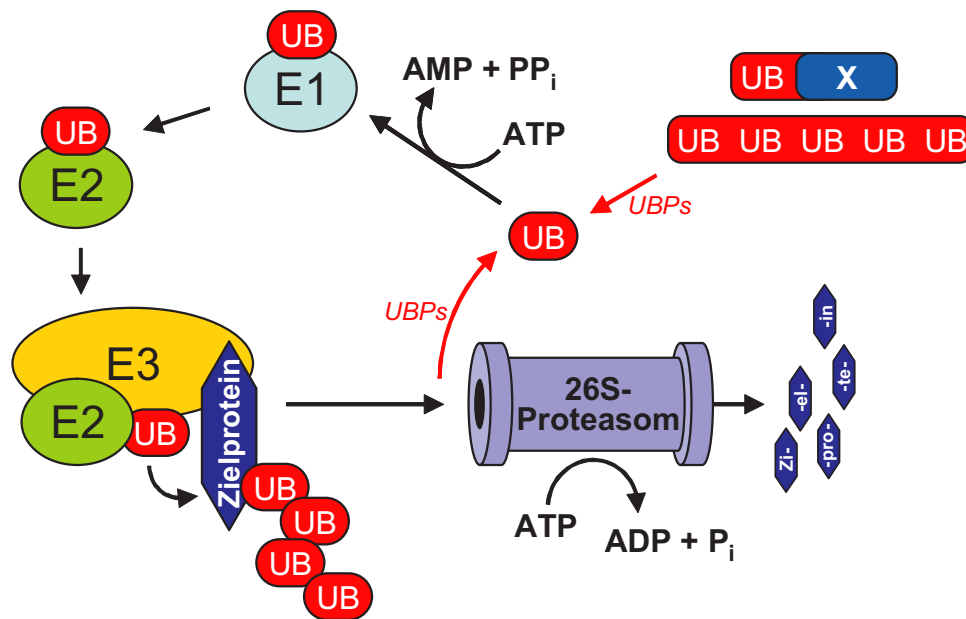


Abb. 9: Das Ubiquitin-System von Hefe. Ubiquitin (UB) wird als Fusion zu ribosomalen Proteinen (X) oder als Multi-UB-Kette exprimiert. Durch UB-spezifische Proteasen (UBPs) werden die einzelnen Einheiten abgespalten. Unter Energieverbrauch wird UB mit dem UB-Aktivierungs-Enzym (E1) verknüpft, anschließend auf ein UB-konjugierendes Enzym (E2) und letztendlich unter Bindung an eine E3-Ligase (E3) auf ein Zielprotein übertragen. Es erfolgt eine Poly-Ubiquitinylierung, welche das Zielprotein dem ATP-verbrauchenden Abbau über das 26S-Proteasom zuführt. UB kann dabei durch UBPs abgespalten und wiederverwendet werden (nach Varshavsky, 2005).

Das in Hefe von vier Genen kodierte UB wird entweder als Fusion zu einem von zwei ribosomalen Proteinen oder als Kette mit fünf Untereinheiten exprimiert. Durch UB-spezifische Proteasen (UBPs) werden die Einheiten hinter dem C-terminalen Glycin an Stelle 67 abgespalten und stehen so der Zelle zu Verfügung. UB kann unter Energieverbrauch mit dem C-terminalen Glycin über eine Thioester-Bindung an ein Cystein des UB-Aktivierungs-Enzyms (E1) verknüpft werden. Anschließend wird es auf ein Cystein eines UB-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Nach Interaktion des Komplexes mit E3-Ligasen, welche eine Substrat-Spezifität für Zielproteine aufweisen, wird UB an ein Lysin des abzubauenen Proteins kovalent gebunden. Als Folge von weiteren Ubiquitinylierungen wird dieses vom 26S-Proteasom zu kleineren Peptiden hydrolysiert, wobei UB aufgrund einer vorzeitigen Abspaltung durch UBPs erneut in den Kreislauf eintreten kann (Welchman *et al.*, 2005).

Diese Erkennung von Ubiquitin-Fusionen durch UBPs dient als Grundlage für das SplitUB-System. Hierbei wird UB in zwei Hälften gespalten und der N-terminale Teil (Nub) so mutiert, dass er nicht mehr ohne Weiteres mit dem C-Terminus (Cub) interagieren kann

(s. Abb. 10, A). Erst bei Fusion der beiden Peptide an zwei interagierende Proteine kann ein natives UB rekonstituiert werden, welches durch UBPs erkannt wird. Ein C-terminal an Cub fusionierter Reporter kann daraufhin abgespalten werden (s. Abb. 10, B).

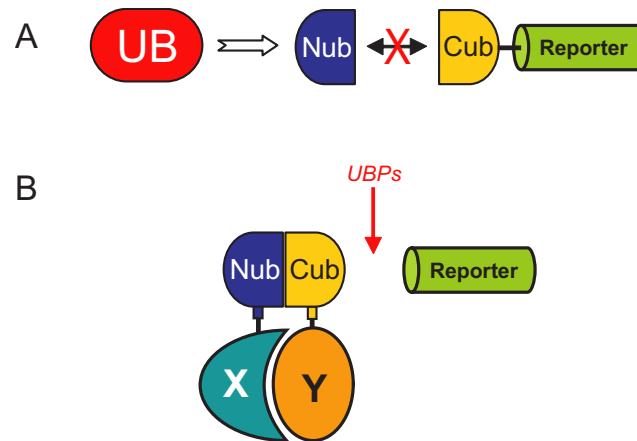


Abb. 10: Grundlage des SplitUB-Systems. (A) Ubiquitin (UB) wird in zwei Hälften Nub und Cub geteilt, die durch die Mutation von Nub kein natives UB rekonstituieren können. (B) Erst bei Interaktion zweier fusionierter Proteine (X und Y) werden sie von UB-spezifische Proteasen (UBPs) erkannt und ein C-terminaler Reporter wird abgespalten.

Entsprechend der „*N-end rule*“, die die Stabilität von Proteinen in Abhängigkeit von der N-terminalen Aminosäure eines Proteins beschreibt, wird der Reporter schneller oder langsamer abgebaut. Findet sich z.B. wie im Großteil aller Proteine ein N-terminales Methionin, so ist der Reporter stabil und kann in Hefe über 20 h nach der Translation noch nachgewiesen werden. Liegen hingegen Phenylalanin oder Arginin am N-Terminus beträgt die Halbwerts-Zeit des Proteins nur wenige Minuten (Bachmair *et al.*, 1986; Gonda *et al.*, 1989). Im SplitUB-System kann somit die Stabilität des Reporters durch dessen N-terminale Aminosäure definiert werden.

Für ein genetisches Selektionsverfahren in Hefe werden Uracil-auxotrophe *ura3*-Mutanten zunächst mit dem Reporter-Konstrukt (Y-Cub-R-lacI'-HA-URA3) transformiert, welches das zu untersuchende Protein (Y) und Cub beinhaltet. C-terminal folgen ein Arginin (R) sowie ein Teil der *lacI*-Sequenz (lacI') und ein HA-Epitoptag, die dem schnelleren Abbau des Reporters dienen, da die Fusion lacI'-HA für die weitere Ubiquitinylierung wichtige Lysine in der Nähe des N-Terminus aufweist. Der eigentliche Reporter wird durch die Orotidin 5'-Monophosphat-Decarboxylase (URA3) aus Hefe gebildet, ein Enzym aus der Pyrimidin-Biosynthese, welches Orotidin 5'-Monophosphat (OMP) in Uridin-Mono-Phosphat (UMP) umwandelt.

In diesen Hefen können dann Nub-Fusionen einer Bibliothek von Proteinen exprimiert werden. Ohne Interaktion bleibt URA3 durch die N-terminale Fusion stabil und das Prä-Toxin

5'-Fluoro-Orotat (FOA) wird in das toxische 5'-Fluoro-Uracil umgewandelt, woraufhin die Zellen absterben (s. Abb. 11, A; Boeke *et al.*, 1984). Bei einer Interaktion der Proteine wird der Reporter abgespalten und schließlich abgebaut. Somit können diese Zellen unter Zugabe von Uracil eine Behandlung mit dem selbst nicht toxischen FOA überleben (s. Abb. 11, B).

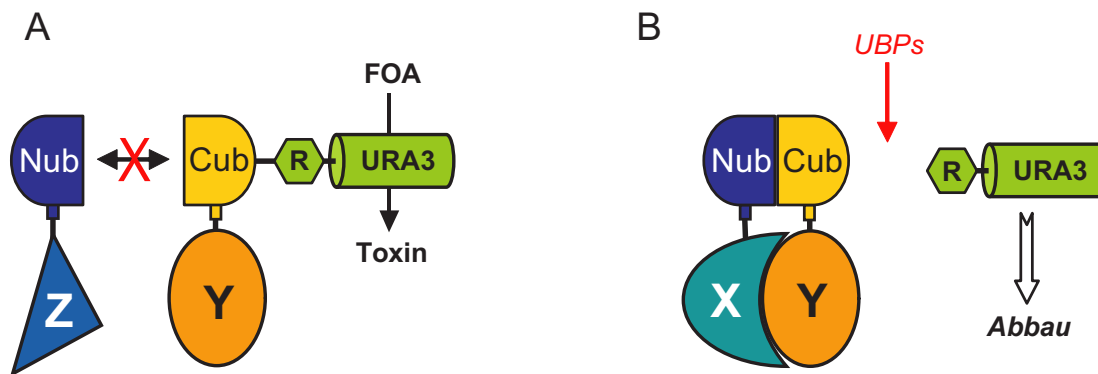


Abb. 11: Genetisches Selektions-Verfahren mit dem SplitUB-System. (A) Ohne Interaktion der fusionierten Proteine (Z und Y) bleibt URA3 stabil und kann FOA in ein Toxin umwandeln. (B) Bei Interaktion der Fusions-Partner (X und Y) wird ein natives UB rekonstituiert, welches durch UBPs erkannt wird. Daraufhin wird der Reporter abgespalten und u.a. durch ein N-terminales Arginin (R) dem Abbau zugeführt.

1.5.2 Konformations-Analysen mit dem SplitUB-System

Das bereits in Kapitel 1.5.1 beschriebene SplitUB-System wurde weiterentwickelt, um die Konformation von Proteinen näher zu bestimmen (Raquet *et al.*, 2001). Dabei werden die beiden Hälften des Ubiquitins in einem Fusionskonstrukt zusammengefasst, in dem das zu untersuchende Protein zwischen Nub und Cub kloniert wird (s. Abb. 12). Als Reporter wird in diesem Fall das Protein Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) verwendet und mit einem Hämagglutinin Epitoptag (HA-Tag) versehen (kurz: „Dha“). Da der Reporter ein N-terminales Methionin enthält, ist er über längere Zeit stabil. Somit können nach Expression dieses Fusionsproteins in Hefe und Extraktion der Proteine sowohl das Gesamt-Protein als auch der abgespaltene Reporter in einer Immun-Reaktion auf einer Membran detektiert werden (Western-Blot). Das Verhältnis zwischen ungespaltenem Gesamt-Protein und Reporter gibt folglich Aufschluss über die Konformation des zu untersuchenden Proteins. Wenn N- und C-Terminus des Proteins in räumlicher Nähe liegen, können Nub und Cub ein natives Ubiquitin formen, welches von den UBPs erkannt wird. Allerdings reicht wahrscheinlich auch eine transiente Interaktion aus, um die Abspaltung des Reporters zu ermöglichen. Daher ist die Interaktion als ein „über die Zeit gemittelter Abstand zwischen

N- und C-Terminus des Proteins“ definiert worden („*time-averaged distance*“, s. Abb. 12, Raquet *et al.*, 2001).

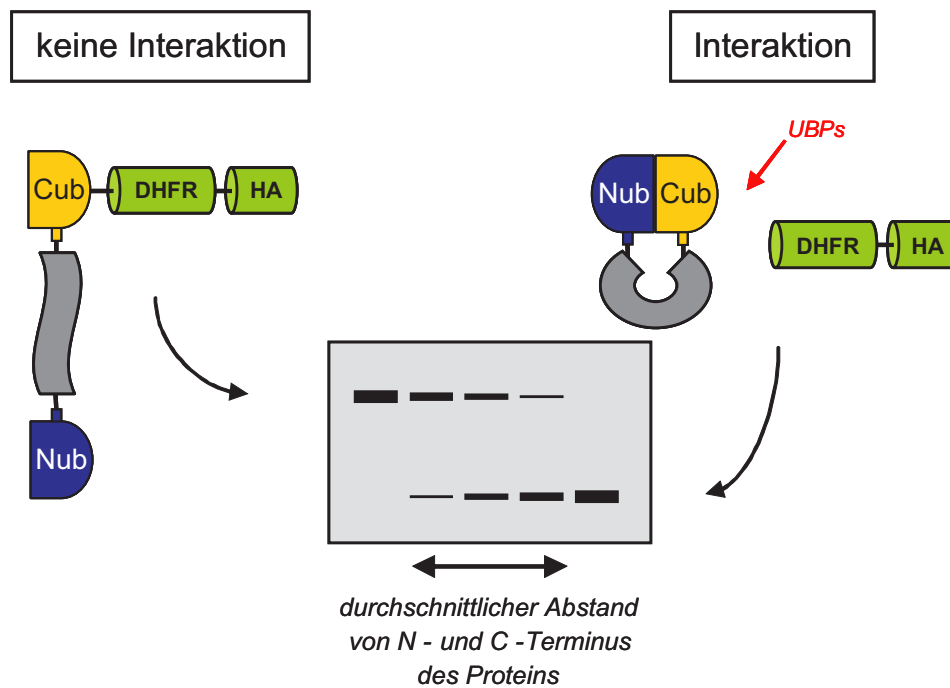


Abb. 12: Modell des SplitUB-Systems *in cis*. Ohne Interaktion der Ubiquitin-Hälften bleibt das Gesamt-Konstrukt erhalten und kann auf einem Western-Blot (Mitte, Modell) über das HA-Epitoptag (HA) detektiert werden. Bei Annäherung von N- und C-Terminus des zu untersuchenden Proteins (grau) interagieren Nub und Cub, folglich wird der Reporter durch UBPs abgespalten und separat detektiert.

Die Anwendungsmöglichkeit dieser Konformations-Untersuchung konnte am Beispiel des Hefe-Proteins Guk1p bewiesen werden, dessen N- und C-Terminus diversen Struktur-Analysen zufolge in räumlicher Nähe liegen (Stehle und Schulz, 1992). So zeigte sich mit der SplitUB-Methode eine fast 100%ige Abspaltung des Reporters. Fpr1p hingegen, dessen Enden in größerem Abstand liegen, zeigte lediglich 25% Spaltung. Auch kleinere Modifikationen wie die Mutation mehrerer C-terminaler Aminosäuren in Fpr1p (Fpr1MCp) konnten sichtbar gemacht werden. Letzteres Konstrukt zeigte ca. 50% Spaltung im Gegensatz zu den im nativen Protein Fpr1p gefundenen 25% (Raquet *et al.*, 2001).

1.5.3 „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC)

Interaktionen von Proteinen *in trans* können mittels „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC) untersucht werden. Diese Methode basiert ähnlich dem SplitUB-System auf der Rekonstitution eines geteilten Proteins, in diesem Fall des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP), welches mit den zu analysierenden Proteinen fusioniert wird (s. Abb. 13). Bei alleiniger Expression des N-Terminus (NYFP) und C-Terminus (CYFP) sollte YFP nicht rekonstituiert werden, da die Affinität der Hälften zueinander zu gering ist. Nur bei einer Interaktion der fusionierten Proteine können sich die YFP-Fragmente so einander annähern, dass eine Fluoreszenz unter UV-Licht detektierbar wird (Hu *et al.*, 2002).

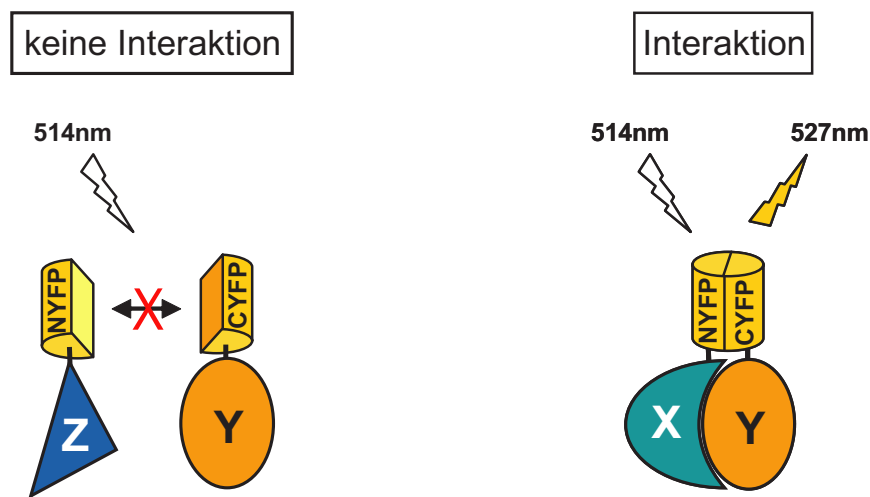


Abb. 13: Modell des „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC). Ohne Interaktion der an den NYFP bzw. CYFP fusionierten Proteine (Z und Y) ist keine Fluoreszenz detektierbar (links). Erst bei Interaktion der Fusions-Proteine (X und Y) wird die YFP-Fluoreszenz mit einem Emissions-Maximum bei 527 nm rekonstituiert (rechts).

Bislang wurde dieses System *in planta* nur in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* und in Zwiebel-Zellen (*Allium cepa*) verwendet (Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004). Am Beispiel der Homo-Dimerisierung des bZIP-Transkriptionsfaktors AtCPRF2 wurde diese Methode für die transiente Expression in *N. benthamiana* in dieser Arbeit im Rahmen einer Kooperation weiterentwickelt und bereits von Walter *et al.* in einer Publikation verwendet (Walter *et al.*, 2004).

1.5.4 „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET)

Die theoretische Anwendung von FRET wurde bereits 1948 von Förster beschrieben (Förster, 1948), und wird daher teilweise auch als „Förster Resonance Energy Transfer“ bezeichnet. Hierbei kann nach Anregung eines Fluorophors (Donor) die Energie auf einen zweiten Partner (Akzeptor) übertragen werden. Durch diesen Prozess wird die Fluoreszenz des Donors teilweise gequencht und die Akzeptor-Fluoreszenz verstärkt (Gabor, 1968). Voraussetzung ist eine Überlappung des Emissions-Spektrums des Donors mit dem Absorptions-Spektrum des Akzeptors sowie eine maximale Entfernung der Moleküle von 10 nm. Einen Einfluss nimmt ebenso die Dipol-Orientierung der Chromophore. Wichtig ist zudem die Tatsache, dass die Transfer-Rate mit zunehmender Distanz exponentiell in sechsfacher Potenz abnimmt, weswegen schon geringe Abstands-Änderungen detektierbar werden.

Diese Methode wurde vielfach mit zwei Versionen des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* angewandt. GFP bildet ein aus 11 β -Faltblättern zusammengesetztes „Fass“, welches eine zentrale α -Helix mit dem Chromophor umgibt. Für FRET dient als Donor das Cyano-fluoreszierende CFP mit einem kurzwelligeren Absorptions- und Emissions-Spektrum, als Akzeptor das Gelb-fluoreszierende YFP mit zu längeren Wellenbereichen verschobenen Spektren. Durch die Überlappung des Emissions-Spektrums von CFP und der Absorption von YFP zwischen 450 nm und 550 nm ist die Möglichkeit von FRET gegeben (s. Abb. 14). Durch die relativ festgelegte Dipol-Orientierung der chromophoren Gruppen in den GFP-verwandten Proteinen (Serin 65, Glycin 66 und Tyrosin 67 bei GFP) hängt die FRET-Effizienz hauptsächlich vom Abstand der Fluorophore und deren räumlicher Ausrichtung zueinander ab.

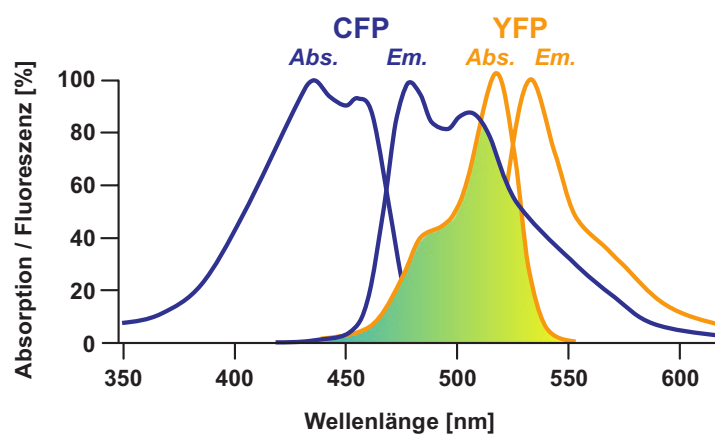


Abb. 14: Fluoreszenz-Spektren von CFP und YFP. Das Emissions-Spektrum (Em.) von CFP (blau) und das Absorptions-Spektrum (Abs.) von YFP (gelb) überlappen in dem gefärbten Bereich (nach Hink *et al.*, 2002).

Das zunächst für intermolekulare Wechselwirkungen von Proteinen in menschlichen Krebszellen angewandte FRET-System mit CFP und YFP (Damjanovich *et al.*, 1995; Gadella und Jovin, 1995) wurde für die Detektion von Konformations-Änderungen und somit für Interaktionen *in cis* weiterentwickelt (s. Abb. 15). Miyawaki *et al.* konnten an dem Konstrukt CFP-CaM-M13-YFP, dem so genannten Chamäleon-Protein, die intra-molekulare Bindung eines Calmodulins (CaM) an das M13-Peptid der „*myosin light chain kinase*“ mittels FRET beobachten (Miyawaki *et al.*, 1997). Diese Bindung ist Calcium-abhängig, so dass die FRET-Effizienz letztendlich von der Ca^{2+} -Konzentration in den untersuchten Kompartimenten bestimmt wird.

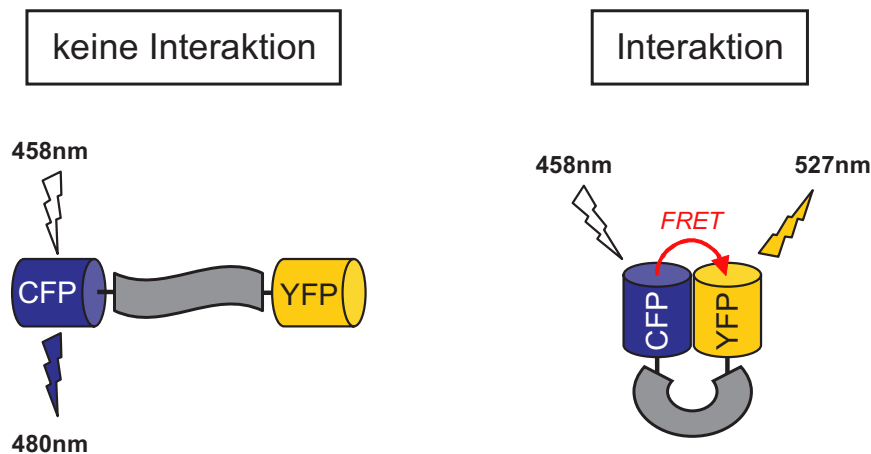


Abb. 15: Modell des intramolekularen FRET. Bei größerem Abstand der Fluorophore absorbiert CFP bei 458 nm und emittiert bei 480 nm (links). Bei räumlicher Nähe kann die Energie des angeregten CFPs auf YFP übertragen werden und es kommt zu einer Fluoreszenz bei 527 nm (rechts).

Eine von Young *et al.* entwickelte Methode zur Quantifizierung von FRET besteht im Akzeptor-„*Photobleaching*“, bei dem YFP durch die Bestrahlung mit UV-Licht (514 nm) gebleicht wird und somit nicht mehr als Akzeptor dienen kann (s. Abb. 16, Young *et al.*, 1994). Dabei werden die Fluoreszenz-Intensitäten beider Fluorophore in mehreren Messungen vor und nach dem Bleichen aufgezeichnet. Bleibt die CFP-Fluoreszenz unverändert, ist der räumliche Abstand der beiden Proteine für einen Energie-Transfer zu groß. Steigt sie hingegen nach dem YFP-Bleichen an, so kann von einer Interaktion ausgegangen werden (s. Abb. 16).

Nachfolgend sind ein Modell des Akzeptor-„Photobleaching“ und die entsprechende Berechnungs-Grundlage zur FRET-Effizienz abgebildet.

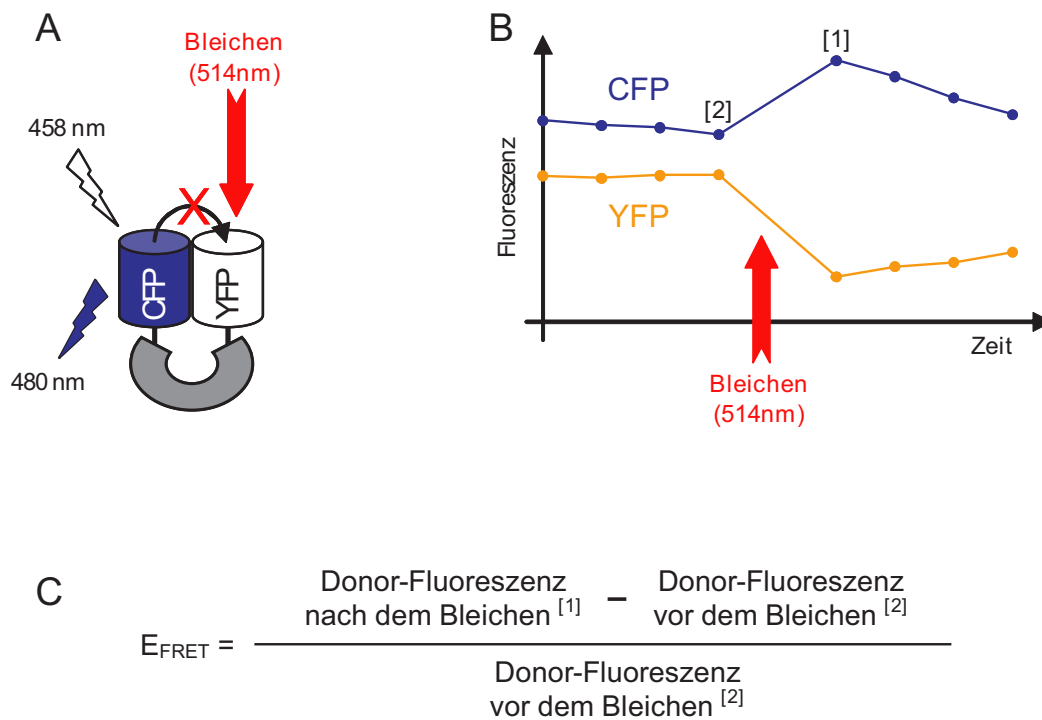


Abb. 16: Modell des Akzeptor-„Photobleaching“. (A) Modell der CFP/YFP-Interaktion nach dem YFP-Bleichen. (B) Vor und nach dem Bleichen werden die Fluoreszenz-Intensitäten gemessen. Bei einem Anstieg der CFP-Fluoreszenz kann von einer Interaktion ausgegangen werden (nach Bhat *et al.*, 2004). Die Zahlen beziehen sich auf die unter (C) angegebene Formel zur Berechnung der FRET-Effizienz (E_{FRET}).

1.6 Zielsetzung

Die biochemische Charakterisierung von Calcium-abhängigen Protein-Kinasen (CDPKs) *in vitro* erfolgte bisher vorwiegend anhand Enzym-kinetischer Messungen mit rekombinanten Proteinen. Nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell führen Calcium-Bindung, Phosphorylierung und Konformations-Änderung des Proteins zu einer Aktivierung der Kinase.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung verschiedener Systeme zur Untersuchung von Konformations-Änderungen *in vivo* mit Hilfe von intramolekularen Interaktionen am Beispiel von NtCDPK2 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*). Hierbei sollte das bereits in Hefe etablierte Split-Ubiquitin-Systems (SplitUB) erstmals in Pflanze über transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* etabliert und angewandt werden. Dabei wurden sowohl Interaktionen einzelner CDPK-Domänen *in trans* als auch Konformations-Änderungen des NtCDPK2-Gesamt-Proteins untersucht. Der Vorteil des Pflanzen-Systems liegt darin, dass die Proteine in ihrem natürlichen Umfeld in der lebenden Pflanze (*in vivo*) betrachtet werden können.

Durch die Einführung verschiedener Mutationen zur gezielten Modulierung der Struktur sollte ein Zusammenhang zwischen Konformation und biologischer Aktivität der CDPK dargestellt werden. Somit sollten bisherige *in vitro*-Daten *in vivo* überprüft werden, um daraus die bislang aufgrund nur unzureichender Struktur-Informationen in verschiedenen Modellen postulierten Mechanismen von CDPK-Aktivierungen zu untersuchen.

Neben der Analyse von mutierten NtCDPK2-Varianten sollte auch versucht werden, die Stimulus-abhängige Aktivierung und die postulierte, damit einhergehende Konformations-Änderung nachzuweisen. Darüber hinaus sollte mit dem SplitUB-System diese Stimulus-Abhängigkeit auch anhand des Cryptochroms 2 aus *A. thaliana* (AtCRY2) untersucht werden.

Zusätzlich zum SplitUB-System wurden weitere Methoden für die transiente Expression in *N. benthamiana* etabliert bzw. optimiert. Einerseits sollte das System des „*Bimolecular Fluorescence Complementation*“ (BiFC) zur Analyse einzelner Domänen-Interaktionen von NtCDPK2 *in trans* genutzt werden. Andererseits sollte der intra-molekulare „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET) zur Untersuchung von NtCDPK2-Konformationen weiterentwickelt werden.

2 Ergebnisse

Um Rückschlüsse auf einen Aktivierungs-Mechanismus von NtCDPK2 ziehen zu können, wurden Untersuchungen der Konformation und Konformations-Änderungen *in vivo* am gesamten Protein vorgenommen. Zur Analyse der CDPK wurden dabei sowohl eine Wildtyp-Version als auch eine deregulierte, aktive Form des Enzyms miteinander verglichen. Diese beiden Formen ließen eine signifikante Konformations-Änderung erwarten, welche durch die Untersuchung mittels des SplitUB-, BiFC- oder FRET-Systems nachgewiesen werden sollte. Eine bereits beschriebene Möglichkeit zur konstitutiven Aktivierung besteht im Entfernen der regulatorischen Sequenzen der Junction-Domäne (J) und der Calmodulin-ähnlichen Domäne (CLD) (Romeis *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2005). Da jedoch die Gesamt-Konformation des kompletten Enzyms analysiert werden sollte, wurde die nachfolgend beschriebene Methode gewählt.

2.1 NtCDPK2 mit mutierter Junction-Domäne

Zur Generierung einer deregulierten und nicht in ihrer Gesamtlänge veränderten NtCDPK2 wurden gezielte Punktmutationen eingeführt. Hierzu wurden drei konservierte Aminosäuren in der Junction-Domäne nach Alanin mutiert (K395A, F397A, K404A; s. Abb. 17), um die Funktionalität von J als Autoinhibitor zu verhindern. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass bei einer Koexpression der verkürzten NtCDPK2(VK) mit der Junction-Domäne der durch VK hervorgerufene Zelltod in *N. benthamiana* verhindert werden kann (Ludwig *et al.*, 2005). Hingegen führten die genannten Mutationen in der Junction-Domäne zu einem HR-ähnlichen Zelltod, da die Aktivität von NtCDPK2(VK) nicht mehr reguliert werden konnte (T. Romeis, unveröffentlicht).

Bei den veränderten Aminosäuren (K395, F397, K404) handelt es sich um solche Positionen, die eine hohe Konservierung zwischen CDPKs, CaMKs und bekannten Pseudosubstrat-Inhibitoren (z.B. Melittin) aufweisen, jedoch vermutlich nicht für eine Interaktion mit Calmodulin bzw. der entsprechenden homologen CLD verantwortlich sein sollten (s. Abb. 17, Harmon *et al.*, 1994).

Zudem wurde in dieser Arbeit die Junction-Domäne aufgrund ihrer Eigenschaft als Pseudo-Substrat mit bekannten Aminosäuresequenz-Motiven verglichen, die für CDPKs als mögliche (Auto-)Phosphorylierungs-Stellen gelten (Übersicht in Harper und Harmon, 2005). Dabei konnten sowohl eine Übereinstimmung mit dem Motiv „Simple 1“ (Roberts und Harmon, 1992) als auch eine Ähnlichkeit für das Motiv #3 (Sebastian *et al.*, 2004) gefunden werden (s. Abb. 18). Daraus resultierend kann als mögliche Phosphorylierungs-Stelle das Serin an Position 398 von NtCDPK2 postuliert werden. Somit war zu erwarten, dass die Einführung der Mutation K395A in Jmut auch eine Erkennung als Pseudo-Substrat verhindert.

NtCDPK2 Jmut	APDKPLDSAVLSRM	AQA	SAMNKL	AKMALRVI
NtCDPK2 J	APDKPLDSAVLSRM	KQF	SAMNKL	KMALRVI
AtCPK1 J	APDKPLDSAVLSRM	KQF	SAMNKF	KMALRVI
CDPK α J	APDKPLDSAVLSRL	KQF	SAMNKL	KMALRVI
CaMKII α J	VASMMHRQETVECL	LKKFN	NARRKL	KGAILTTM
Melittin	GIGAVL	KVLETTGL	PA	LISWIKRKRQQ
		φ	φ	φ $\varphi\varphi$

Abb. 17: Sequenzvergleich von Junction-Domänen sowie dem Pseudosubstrat Melittin. Aminosäure-Sequenzvergleich der Junction-Domänen von NtCDPK2, AtCPK1 aus *A. thaliana* und CDPK α sowie CaMKII α aus Sojabohne werden mit Melittin verglichen. Rot = in NtCDPK2(Jmut) mutierte Aminosäuren K395A, F397A, K404A; Gelb = für die CaM-Bindung wichtige, konservierte Aminosäuren; Grün = in AtCPK1 für Auto-Inhibition essentielles Phenylalanin; \blacklozenge = zwischen CDPKs und CaM-abhängigen Kinasen hoch konservierte Aminosäuren; φ : zwischen CDPKs und CaM-abhängigen Kinasen konservierte hydrophobe Aminosäuren (nach Harmon *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1994).

Motiv „Simple 1“		BXXS
Motiv #3		φ S φ XBB
NtCDPK2 J	APDKPLDSAVLSRM	KQF SAMNKL K MALRVI
NtCDPK2 Jmut	APDKPLDSAVLSRM	AQA SAMNKL A KMALRVI

Abb. 18: Sequenzvergleich von NtCDPK2(J) mit typischen Phosphorylierungs-Motiven. B = basische Aminosäure, Lysin oder Arginin; φ = hydrophobe Aminosäure; X = beliebige Aminosäure; Rot = in NtCDPK2(Jmut) mutierte Aminosäuren K395A, F397A, K404A; Blau = aus der Übereinstimmung mit beiden aufgeführten Motiven vorhergesagte Phosphorylierungs-Stelle Serin 398; Gelb = mit Motiv #3 nicht übereinstimmende Aminosäure (nach Harper und Harmon, 2005).

Die zuvor beschriebenen Mutationen in der Junction-Domäne konnten in den Vektor pXCS-HASrep NtCDPK2 (bereitgestellt von Dr. C.-P. Witte, MPIZ, Köln) über zielgerichtete Mutagenese eingebracht werden. Nach Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* und transienter Expression in *N. benthamiana* wurden zunächst Proben für einen Western-Blot genommen. Aufgrund der wesentlich schwächeren Expression der mutierten Version musste der entsprechende Teil des Western-Blots länger entwickelt werden. Ein elektrophoretischer Shift nach Stress-Stimulus sowie dessen Rückgang nach 180 min konnte analog der Wildtyp-Version ebenfalls bei NtCDPK2mut beobachtet werden (s. Abb. 19). Die obere Shift-Bande, die durch Auto-Phosphorylierung verursacht wird (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht), war jedoch etwas schwächer als im Wildtyp. Hingegen verstärkte sich die untere Shift-Bande, die durch eine Phosphorylierung von einer anderen, bislang unbekanntem Kinase verursacht wird (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht).

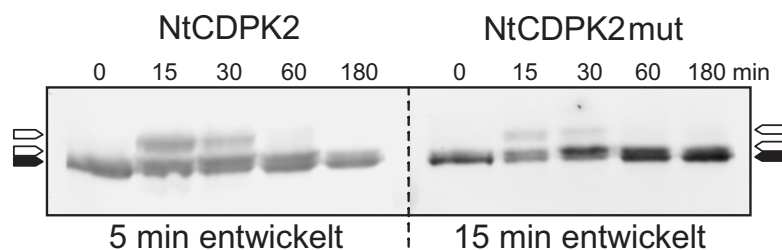


Abb. 19: Vergleich NtCDPK2 und NtCDPK2mut. Nach transienter Expression der beiden Versionen von NtCDPK2 im binären Vektor pXCS-HASTrep in *N. benthamiana* wurden Blatt-Proben im Zeitkurs bis zu 180 min nach Stress-Stimulus durch Infiltration von H₂O genommen. Nach Auftrennung der Protein-Extrakte in einer SDS-PAGE wurden die CDPKs im Western-Blot mittels *Strep*-Tactin[®]-AP detektiert. \blacktriangleright = Grundform der Konstrukte bei ca. 68 kDa; \square = aktivierte Formen (Shifts) bis zu ca. 70 kDa.

Um den Einfluss der Enzym-Aktivität auf eine biologische Stress-Reaktion zu untersuchen, wurden NtCDPK2, NtCDPK2mut und NtCDPK2(VK) in *N. benthamiana* exprimiert und unter Hochlicht-Bedingungen inkubiert. Nach zwei Tagen konnten keine makroskopischen Veränderungen an Blättern, die NtCDPK2 exprimierten, beobachtet werden (s. Abb. 20). Auch bei Betrachtung unter UV-Licht und nach Färbung mit Trypanblau ließ sich keine Zelltod-Reaktion erkennen. Im Gegensatz dazu zeigte die deregulierte Version NtCDPK2(VK) bei den drei gewählten Analyse-Methoden einen signifikanten Zelltod. Im Fall der in dieser Arbeit erstmals *in planta* exprimierten NtCDPK2mut konnten schwache Zelltod-Symptome als bräunliche Färbung im sichtbaren Licht, zudem leichte Autofluoreszenz unter UV-Licht und deutlich erkennbare, dunkle Flecken toter Zellen nach der Trypanblau-Färbung beobachtet werden (s. Abb. 20).

Hiermit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass eine Mutation der für die Bindung an die Kinase-Domäne verantwortlichen Aminosäuren in J zu einer teilweisen Aktivierung von NtCDPK2 führt.

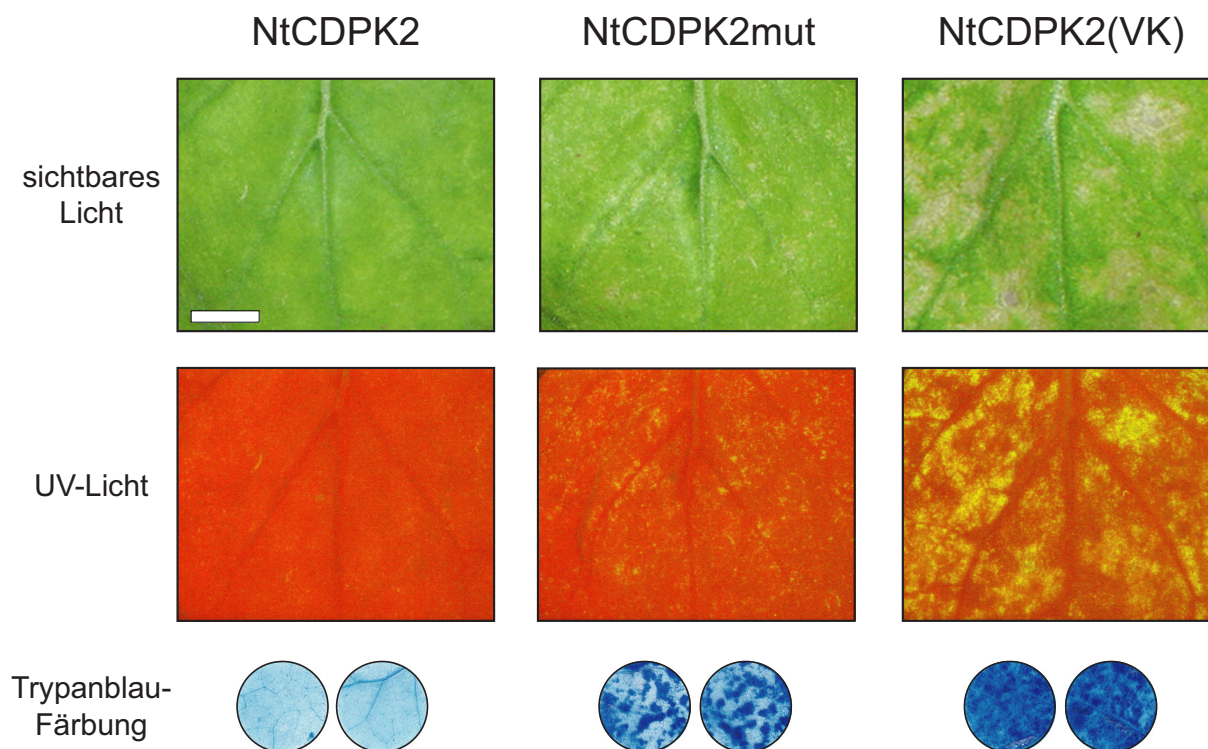


Abb. 20: Phänotypen von NtCDPK2-Konstrukten in *N. benthamiana*. Nach transienter Expression des Wildtyps NtCDPK2, der in J mutierten Version (NtCDPK2mut) und der deregulierten Version NtCDPK2(VK) aus pXCS-HAStrep in *N. benthamiana* wurden die Pflanzen zwei Tage unter Hochlicht-Bedingungen inkubiert. Bei sichtbarem Licht, unter UV-Licht und nach Trypanblau-Färbung konnten Zelltod-Symptome beurteilt werden. UV-Bilder wurden zur Verdeutlichung mit jeweils gleichartiger Kontrastverstärkung durch Adobe® Photoshop® optimiert. Der weiße Balken entspricht 1 cm.

2.2 Anwendung des SplitUB-Systems für NtCDPK2-Domänen *in trans*

2.2.1 SplitUB-System in Hefe

Zum genaueren Verständnis der Konformation von NtCDPK2 wurden die Interaktionen einzelner Domänen des Proteins miteinander untersucht. Mit dem bereits in Hefe etablierten SplitUB-System konnten zunächst die Interaktionen von VK sowie CLD im Vektor pCup mit der nativen oder mutierten Junction-Domäne (J bzw. Jmut) in pMet getestet werden. Eine Interaktion der Domänen und somit von Nub und Cub führt dabei zur Abspaltung des Reporters R-lacI'-HA-URA3, der durch das N-terminale Arginin sowie aufgrund einer

fusionierten Teilsequenz des *lacI*-Gens (*lacI'*) und des HA-Epitoptags schneller abgebaut wird. In Folge werden die Zellen Uracil-auxotroph und zugleich FOA resistent.

Nachfolgend wurden Hefe-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Nub- und Cub-Konstrukten kotransformiert. Zusätzlich wurden als Kontrolle Calmodulin aus Gerste (*Hordeum vulgare*, HvCaM3) und der negative Resistenz-Regulator AtMLO1 aus *A. thaliana* untersucht, für die eine Ca^{2+} -abhängige Regulation der Interaktion beschrieben ist (Kim *et al.*, 2002). Im Fall der mit VK- bzw. CLD- und J- bzw. Jmut-Konstrukten kotransformierten Hefen war kein Wachstum auf FOA-Medium erkennbar (s. Abb. 21). Somit gelang es nicht, eine Interaktion zwischen den hier getesteten NtCDPK2-Domänen in Hefe nachzuweisen. Hingegen ließ sich bei der Calmodulin-Kontrolle mit J ein deutliches Wachstum auf FOA-Medium erkennen, welches hingegen im Fall von HvCaM3 mit Jmut schwächer ausfiel (s. Abb. 21). Hieraus kann auf eine Interaktion der beiden Proteine geschlossen werden, die offensichtlich durch die Mutationen in Jmut abgeschwächt wird.

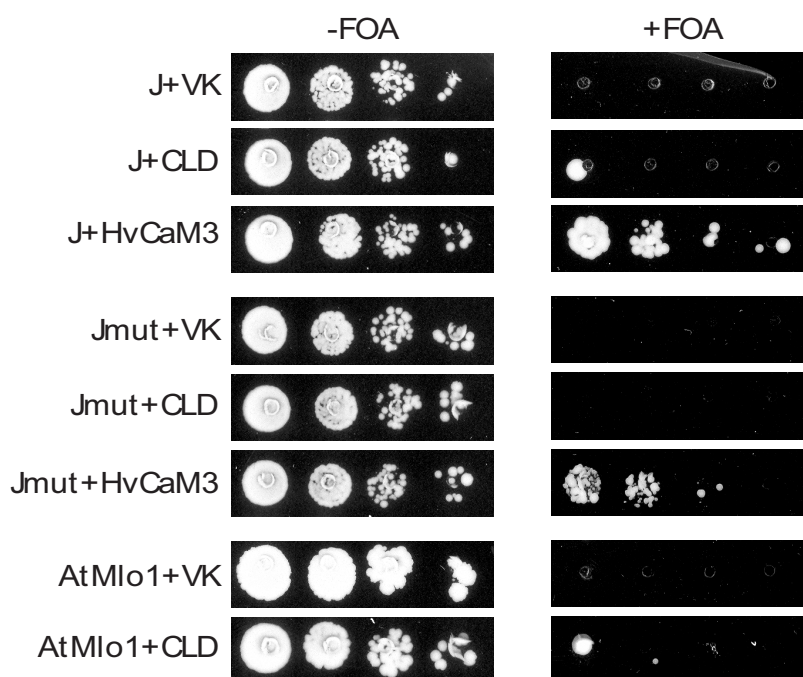


Abb. 21: Wachstumstest transformierter Hefen. Hefe-Zellen wurden mit Kombinationen von pMet-[NtCDPK2(J), NtCDPK2(Jmut) oder AtMlo1]-Cub-R-*lacI'*-HA-URA3 und pCup-Nub-[NtCDPK2(VK)-HA, NtCDPK2(CLD)-HA oder HvCaM3] kotransformiert. Es wurden jeweils 10 μl von Verdünnungen der Kulturen ($\text{OD}_{600} = 0,1$ bis 0,0001) auf Hefe-Minimalmedium ohne Histidin und Tryptophan mit 100 mM CuSO_4 als Wachstums-Kontrolle (links) und mit zusätzlichen 10 μM FOA (rechts) aufgetropft. Bei Interaktion der fusionierten Proteine kommt es zur Interaktion von Nub und Cub, zur Abspaltung und anschließendem Abbau des Reporters und somit zu einer Resistenz gegenüber FOA.

2.2.2 SplitUB-System *in planta*

Zur transienten Expression der Konstrukte in *N. benthamiana* wurden die ORFs der Hefe-Plasmide in den binären Vektor pAMPAT-MCS unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus kloniert. Hierbei wurde der Reporter des Hefe-Systems (URA3) durch GFP ersetzt. Durch diese Fusion sollte es gelingen, sowohl den Reporter als auch das vollständige Reporter-Konstrukt (J-Cub-R-lacI'-HA-GFP) in einer Western-Blot-Analyse über eine Kombination zweier anti-GFP-Antikörper zu detektieren.

Wie im Hefe-System (s. Kapitel 2.2.1) wurden auch *in planta* die Interaktionen zwischen J und VK bzw. J und CLD untersucht. Die Expression von Nub-NtCDPK2(CL D)-HA konnte mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörpern bestätigt werden, hingegen war die für das VK-Konstrukt erwartete Bande bei 48 kDa vermutlich durch den Hintergrund überlagert (s. Abb. 22).

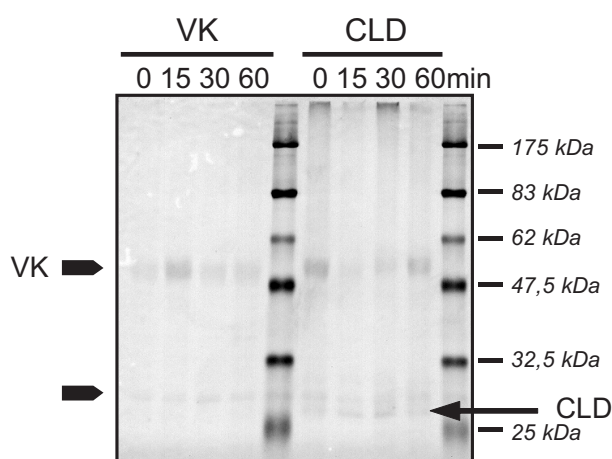


Abb. 22: Expression von Nub-Konstrukten *in planta*. Nach transienter Expression der SplitUB-*in trans*-Konstrukte pXS Nub-NtCDPK2(VK oder CLD)-HA in *N. benthamiana* wurden vor und im Zeitverlauf nach Injektion von H₂O Proben gezogen. Exprimierte Proteine wurden mit anti-HA-Antikörpern im Western-Blot detektiert. VK = Nub-NtCDPK2(VK)-HA (48 kDa), wahrscheinlich überlappend mit der oberen Hintergrund-Bande; CLD, Pfeil = Nub-NtCDPK2(CL D)-HA (28 kDa); ■ = Hintergrund-Banden.

In einem weiteren Western-Blot mit anti-GFP-Antikörpern konnte eine deutliche Bande im erwarteten Größenbereich von 42 kDa dem Reporter-Konstrukt NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA-GFP zugeordnet werden. Eine weitere Bande mit 29 kDa entspricht dem Reporterprotein R-lacI'-HA-GFP, obwohl dieses rechnerisch ein Molekular-Gewicht von 33 kDa aufweist. Ursache hierfür ist üblicherweise die Abweichung des voreingefärbten Protein-Größenmarkers. Die gleichen Banden konnten auch bei Koexpression mit den Nub-Konstrukten detektiert werden. Zusätzlich zeigte sich jedoch eine schwache, mögliche Abbau-

Bande im Bereich von 35 kDa bei der Kombination mit dem CLD-Fusionsprotein. Diese konnte jedoch in weiteren Experimenten nicht uneingeschränkt reproduziert werden.

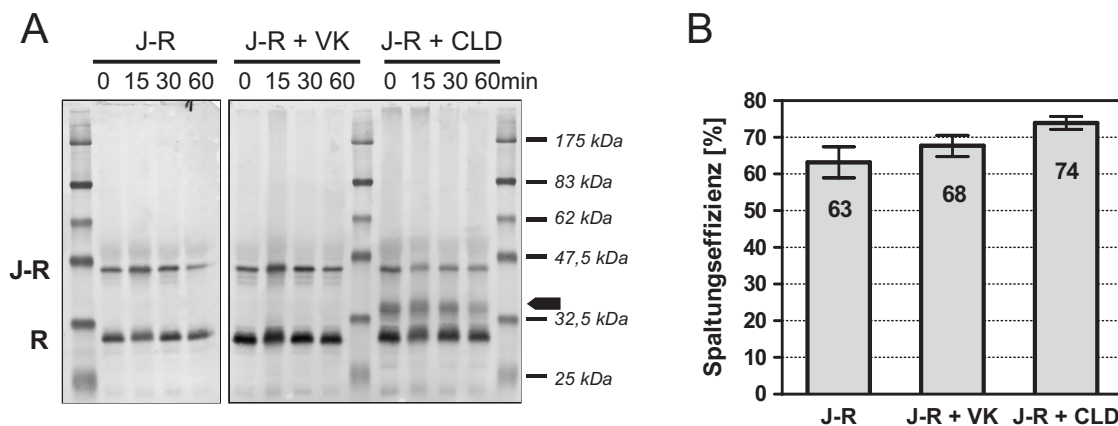


Abb. 23: Koexpression von SplitUB-*in trans*-Konstrukten *in planta*. (A) Nach transienter Expression in *N. benthamiana* wurden vor und im Zeitverlauf nach Injektion von H₂O Blattproben gezogen. Exprimierte Proteine wurden mit anti-GFP-Antikörpern im Western-Blot detektiert. VK = Nub-NtCDPK2(VK)-HA; CLD = Nub-NtCDPK2(CLD)-HA; J-R = NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA-GFP (42 kDa); R = Reporter R-lacI'-HA-GFP (33 kDa); ■ = eventuelles Abbauprodukt. (B) Als Spaltungseffizienz wurde das Verhältnis von *Reporter-Bande* zu [*Gesamtkonstrukt-Bande* + *Reporter-Bande*] über das Computer-Programm Image Quant bestimmt und über die vier bzw. bei „J-R + CLD“ acht Spuren gemittelt (Western-Blot z.T. nicht gezeigt). Die Fehlerbalken geben den Standard-Fehler an.

Eine quantitative Auswertung der Banden-Intensitäten zeigte bei alleiniger Expression des Reporter-Konstrukts NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA-GFP bereits eine ca. 63%ige Abspaltung des Reporters. Die mäßige, jedoch nicht signifikante Steigerung der Spaltungs-Effizienz auf 65-70% bei Koexpression mit dem VK-Fusionsprotein kann auf eine geringfügige Interaktion zwischen VK und J hinweisen. Hingegen konnte bei Kombination mit CLD eine erheblich gesteigerte Spaltungs-Rate von 74% gezeigt werden, womit eindeutig eine Interaktion zwischen J und der CLD bewiesen ist. (s. Abb. 23, B).

Wie im Western-Blot zu erkennen ist, lässt sich eine Stimulus-Abhängigkeit der Interaktions-Stärken zwischen J und VK bzw. J und CLD nach der Injektion von H₂O nicht nachweisen (s. Abb. 23, A).

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss der lacI'-HA-Sequenzen im Pflanzen-System beurteilt werden, welcher im Hefe-System zum schnelleren Abbau des Reporters führt. Mit einem Reporter-Konstrukt ohne lacI'-HA (J-Cub-R-GFP) konnte jedoch keine deutlich gesteigerte Akkumulation des Reporters beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

2.3 Anwendung des SplitUB-Systems für NtCDPK2 *in cis*

Die Untersuchung von NtCDPK2 hinsichtlich ihrer Gesamt-Konformation fand ebenfalls über das SplitUB-System statt. Hierzu wurde Nub an den N-Terminus der CDPK und Cub mit dem Reporter (Dha) an den C-Terminus der CDPK fusioniert. Bei einer intramolekularen Interaktion (*in cis*) von Nub und Cub wird der Reporter ebenso wie im *trans*-System abgespalten, jedoch anschließend nicht abgebaut, da der N-Terminus von einem stabilisierenden Methionin gebildet wird. Folglich kann Dha auf einem Western-Blot mittels anti-HA-Antikörper detektiert werden.

Als Zielvektor für die Klonierung diente pCup-Nub-p53-Cub-Dha (Johnsson, 2002). Zur Kontrolle wurden die in selbigem Vektor befindlichen Hefe-Gene GUK1, FPR1 und FPR1MC von Dr. Nils Johnsson (Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruhe) bereitgestellt (Raquet *et al.*, 2001). Für die Expression in Pflanze wurde der vollständige Offene Leserahmen in den binären Vektor pAMPAT-MCS hinter den konstitutiven 35S-Promotor kloniert.

Am Hefe-System war bereits beschrieben worden, dass Guk1p eine nahezu 100%ige Spaltung zeigt, Fpr1p 25% und die C-terminal mutierte Version Fpr1pMC 50% (Raquet *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse sollten zunächst in Hefe reproduziert und mit denen unterschiedlicher NtCDPK2-Konstrukte verglichen werden, um anschließend dieselben Hefe- sowie Pflanzen-Fusionsproteine transient *in planta* exprimieren und untersuchen zu können.

2.3.1 SplitUB-System in Hefe

Anhand des Hefe SplitUB-Systems *in cis* konnten die Ergebnisse der Publikation von Raquet *et al.* weitestgehend reproduziert werden (Raquet *et al.*, 2001). Die Abspaltungs-Rate des Reporters mit einem Molekular-Gewicht von 24 kDa beim Guk1p-Fusionskonstrukt betrug über 90%. Für Fpr1p wurden 27% Spaltung detektiert, während bei mutiertem C-Terminus (Fpr1pMC) 41% Spaltung erreicht werden konnten. Dies liegt unterhalb des publizierten Wertes von 50% (Raquet *et al.*, 2001).

Das NtCDPK2-Konstrukt zeigte eine Spaltungs-Effizienz von 32%, während die in J mutierte Variante eine schwächere Rate von 22% aufwies (s. Abb. 24). Daraus kann geschlossen werden, dass die Mutation in J zu einer veränderten Gesamt-Konformation von NtCDPK2 führt, in welcher N- und C-Terminus des Proteins eine stärkere räumliche Trennung als im Wildtyp aufweisen.

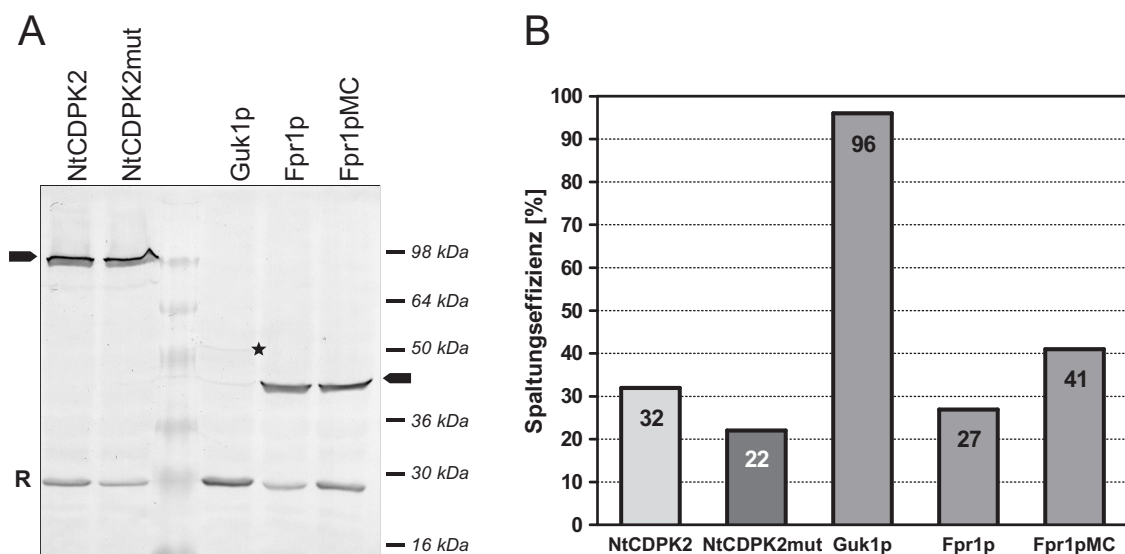


Abb. 24: Vergleich von NtCDPK2 mit bekannten Konstrukten im SplitUB-System in Hefe. (A) Protein-Extrakte von Hefen transformiert mit verschiedenen Expressionsvektoren (pCup-Nub-X-Cub-Dha; X wie angegeben) wurden mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. R = Reporterbande, 24 kDa; \blacktriangleright = Gesamtprotein-Bande der NtCDPK2- bzw. Fpr1p-Konstrukte, \star = Guk1p-Fusionsprotein. (B) Als Spaltungseffizienz wurde das Verhältnis von Reporter-Bande zu [Gesamtkonstrukt-Bande + Reporter-Bande] über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Daten eines mit zwei unterschiedlichen Helligkeiten gescannten Western-Blots wurden gemittelt.

Wie dem nachfolgenden Western-Blot zu entnehmen ist, kann auch bei der Expression eines um die CLD verkürzten Konstrukts (VKJ) in Hefe eindeutig eine Reporter-Bande detektiert werden (s. Abb. 25). Wiederum zeigte sich bei dem Konstrukt mit mutierter Junction-Domäne eine schwächere Spaltungseffizienz von 29% im Vergleich zu 47% beim Wildtyp. Somit ist auch im VKJ-Konstrukt ein Unterschied zwischen Wildtyp und mutierter CDPK-Form nachweisbar.

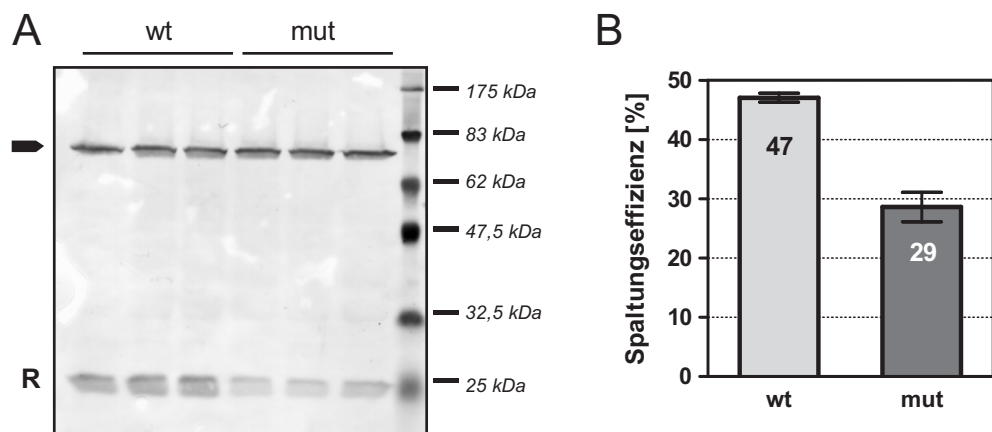


Abb. 25: NtCDPK2(VKJ) im SplitUB-System in Hefe. (A) Je drei unabhängig transformierte Hefen mit dem Expressionsvektor pCup-Nub-NtCDPK2(VKJ)-Cub-Dha (wt) bzw. VKJmut (mut) wurden 16 h kultiviert und nach Einstellung der $OD_{600} = 1,0$ mit $100 \mu\text{M}$ CuSO_4 (f.c.) induziert. Eine Stunde nach Induktion der SplitUB-*in cis*-Konstrukte wurden Proteine aus 1 ml Kultur isoliert, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. R = Reporterbande, 24 kDa; \blacktriangleright = Gesamtprotein-Bande der NtCDPK2-Konstrukte, 79 kDa. (B) Als Spaltungseffizienz wurde das Verhältnis von Reporter-Bande zu [Gesamtkonstrukt-Bande + Reporter-Bande] über das Computer-Programm Image Quant bestimmt und über drei Spuren gemittelt. Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Spaltungs-Werte der drei Spuren dar.

Von weiterem Interesse war der Einfluss der Calcium-Bindung an die CLD auf die Gesamtkonformation von NtCDPK2. Hierzu wurde wiederum das Konstrukt Nub-NtCDPK2-Cub-Dha in Wildtyp- und mutierter Form in Hefe exprimiert und gleichzeitig dem Kulturmedium EGTA oder CaSO_4 zugegeben. Die Analyse der Extrakte zeigt den Einfluss von EGTA auf das Laufverhalten der Proteine, da nach Zugabe die Banden des Gesamt-Konstrukts an Schärfe verlieren. Eine Erhöhung der Calcium-Konzentration führte hingegen zu keiner detektierbaren Veränderung (s. Abb. 26).

Die quantitative Auswertung ergibt wiederum für Jmut-Konstrukte eine geringere Interaktion als für die wt-Version. Darüber hinaus ist die Spaltungs-Rate in Anwesenheit von EGTA im Wildtyp leicht erniedrigt und für beide Formen durch Zugabe von Calcium deutlich erhöht. Hieraus lässt sich auf eine „offenere“ Konformation des NtCDPK2-Proteins nach Bindung von Calcium schließen.

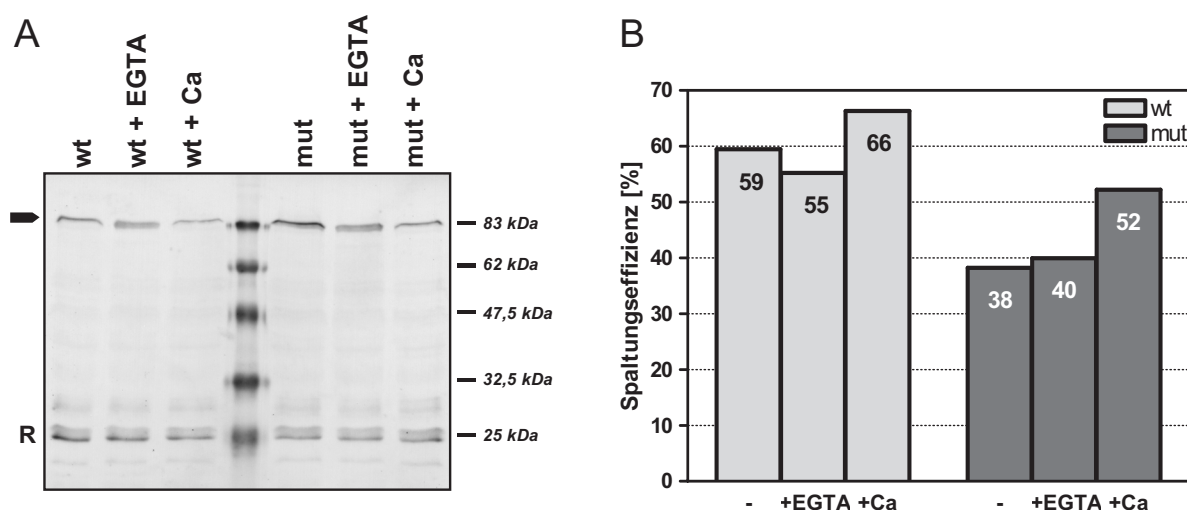


Abb. 26: Spaltungs-Raten in Abhängigkeit der Calcium-Konzentration. (A) Hefe-Kulturen mit pCup-Nub-NtCDPK2-Cub-Dha (wt) oder der in J mutierten Version (mut) wurden 16 h kultiviert und nach Einstellung der $\text{OD}_{600} = 1,0$ mit $100 \mu\text{M}$ CuSO_4 f.c. induziert. Zusätzlich wurden 5 mM EGTA (+EGTA) oder 5 mM CaSO_4 f.c. (+Ca) zugegeben. Eine Stunde nach Induktion der SplitUB-*in cis*-Konstrukte wurden Proteine aus 1 ml Kultur isoliert, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot mit anti-HA-Antikörper durchgeführt. (B) R = Reporterbande, 24 kDa; \blacksquare = Gesamtprotein-Bande, 79 kDa. (B) Als Spaltungseffizienz wurde das Verhältnis von Reporter-Bande zu [Gesamtkonstrukt-Bande + Reporter-Bande] über das Computer-Programm Image Quant bestimmt.

2.3.2 SplitUB-System *in planta*

Zur Untersuchung der Konformationen von Gesamtproteinen in Pflanze wurden zunächst die ORFs der Hefe-Konstrukte des SplitUB-Systems in den binären Vektor pAMPAT-MCS unter Kontrolle des 35S-Promotors (pXS) bzw. des Ethanol-induzierbaren Promotors pAlcA (pXCAG-Strep) kloniert. Nach Transformation in Agrobakterien und transients Expression in *N. benthamiana* gelang es, die Protein-Extrakte über einen Western-Blot und anti-HA-Antikörper zu analysieren. Auch in diesem *in cis*-System konnten die Banden des Gesamtkonstrukts und des Reporters Dha eindeutig nachgewiesen werden. Zudem ließ sich ein Unterschied in der Spaltungseffizienz des Guk1p-Konstrukts (76%) im Vergleich zu Fpr1p (50-60%) erkennen, die Differenz zwischen Fpr1p und Fpr1pMC war jedoch weniger deutlich als nach Expression in Hefe (s. Abb. 27).

Diese Ergebnisse zeigen damit, dass das SplitUB-System auch in Pflanze, hier nach transients Expression in *N. benthamiana*-Blättern, erfolgreich angewandt werden kann und tendenziell vergleichbare Aussagen liefert.

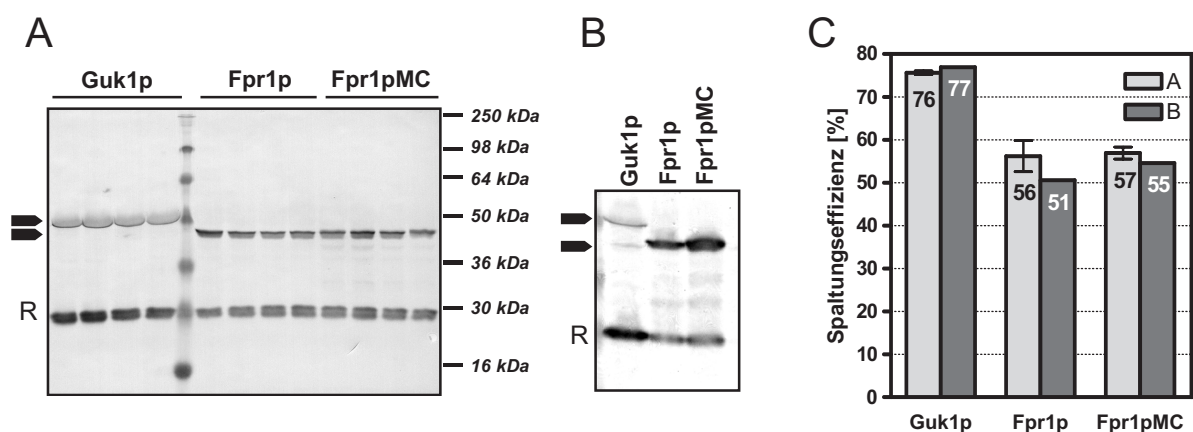


Abb. 27: Hefe-Proteine im SplitUB-System *in planta*. (A) Protein-Extrakte von je vier Proben transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter mit den Konstrukten pXS Nub-GUK1-Cub-Dha, bzw. FPR1 oder FPR1MC wurden mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. R = Reporterbande, 24 kDa; \blacktriangleright = Gesamtprotein-Bande der Guk1p- bzw. Fpr1p(MC)-Konstrukte. (B) wie unter A, es wurde jeweils nur eine Spur pro Konstrukt hier jedoch eines anderen Experiments aufgetragen. (C) Als Spaltungseffizienz wurde das Verhältnis von Reporter-Bande zu [Gesamtkonstrukt-Bande + Reporter-Bande] aus A und B über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Für die Werte aus A wurde über die gezeigten vier Spuren gemittelt und der Standardfehler dargestellt.

Nach Untersuchung der Hefe-Proteine sollten in anschließenden Experimenten die entsprechenden NtCDPK2-Konstrukte *in planta* exprimiert und analysiert werden. Da NtCDPK2 in Tabak in der Membran-Fraktion lokalisiert werden kann (Romeis *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2001), wurde zur Untersuchung des Einflusses der N-terminalen Myristoylierung zunächst das Konstrukt pXS Nub-NtCDPK2-Cub-Dha generiert. Nachfolgend wurde die für die ersten 20 Aminosäuren der CDPK kodierende DNA-Sequenz von NtCDPK2 vor den ORF kloniert (pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha), da hier die potentielle Myristoylierungs-Sequenz liegt (s. Abb. 6; Romeis *et al.*, 2001). Diese Sequenz sollte der Lokalisierung des Konstrukts an einem Membran-Kompartiment (Zellmembran) dienen, um so den natürlichen Gegebenheiten des Enzyms näher zu kommen. In einem Zeitkurs nach hypo-osmotischem Stimulus konnten exprimierenden *N. benthamiana*-Blättern Proben entnommen werden. Ein deutlicher Unterschied in der Spaltungsrate vor und nach Stress-Stimulus war bei keinem der Konstrukte zu erkennen (s. Abb. 28, A). Darüber hinaus zeigten die Konstrukte ohne Myristoylierungs-Sequenz mit einer Rate von jeweils 60-65% keine Spaltungs-Unterschiede zwischen Wildtyp- und in J mutierter Version. Deutlich sichtbar war hingegen eine Differenz bei Proteinen mit Myristoylierungs-Sequenz. Obwohl das Expressions-Niveau der in J mutierten Form sehr viel niedriger und ein deutlicher Hintergrund noch oberhalb der Bande des Gesamt-Proteins zu erkennen war, konnte eine geringere Spaltungseffizienz von ca. 42% im Vergleich zum Wildtyp mit 55% nachgewiesen werden (s. Abb. 28, B).

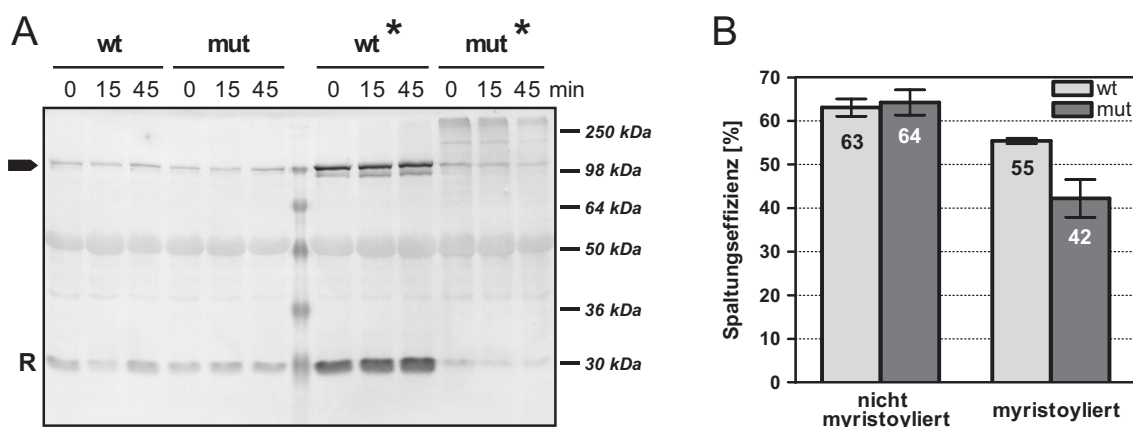


Abb. 28: Abhängigkeit von korrekter Lokalisierung im SplitUB-System *in planta*. (A) Protein-Extrakte von Proben transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter mit den Konstrukten pXS Nub-NtCDPK2-Cub-Dha, bzw. mit der Myristoylierungs-Sequenz (*) im Zeitkurs nach Infiltration von H₂O wurden mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. wt = Wildtyp NtCDPK2; mut = in J mutierte Form; R = Reporterbande, 24 kDa; ■ = Gesamtprotein-Bande, 100 kDa. (B) Als Spaltungseffizienz wurde das Verhältnis von Reporter-Bande zu [Gesamtkonstrukt-Bande + Reporter-Bande] über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Es wurde über die gezeigten drei Spuren eines Konstrukts sowie den gleichen Datensatz eines weiteren Western-Blots gemittelt und der Standardfehler dargestellt.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für eine Konformations-Änderung weitere regulatorische Prozesse erforderlich sind, wie z.B. eine Phosphorylierung durch eine Membran-gebundene Kinase, die eine bestimmte intrazelluläre Lokalisierung voraussetzen. Weiterhin fällt auf, dass die Spaltungs-Effizienzen nach Myristoylierung insgesamt niedriger sind. Dies könnte auf erhöhten unspezifischen Abbau aufgrund der starken Überexpression hinweisen, wobei nicht korrekt lokalisierte Proteine der Abbau-Maschinerie zugeführt werden.

Um dies zu überprüfen musste als nächstes kontrolliert werden, ob bereits ohne Interaktion von Nub und Cub eine Abspaltung des Reporters erfolgt. Als Kontrolle wurden dabei die Myristoylierungs-Sequenz sowie die Nub-Domäne aus dem Vektor pXCAG-Strep *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha deletiert, woraus das Konstrukt pXCAG-Strep NtCDPK2-Cub-Dha resultierte. Nach transienter Expression in Pflanze waren bereits 34% Abspaltung des Reporters ohne Nub detektierbar. Die Spaltung des Proteins mit Nub lag jedoch mit 57% deutlich höher (s. Abb. 29). Bei der Auswertung der Daten ist dementsprechend ein gewisser, System-abhängiger Hintergrund nicht völlig auszuschließen.

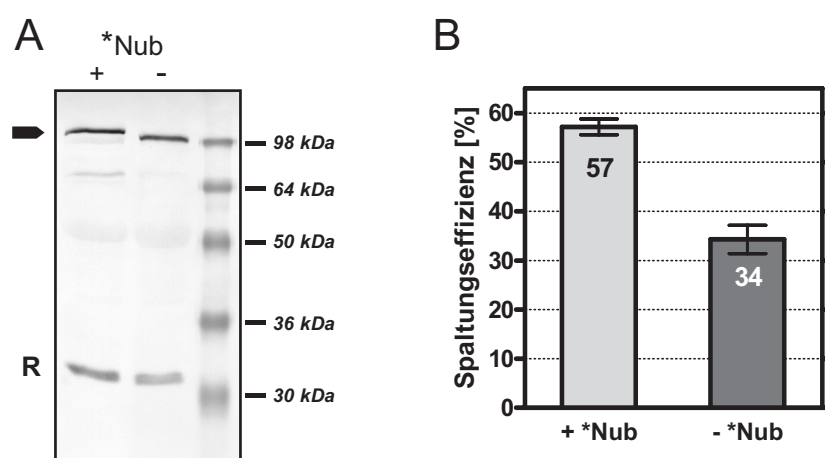


Abb. 29: Spaltungs-Raten im SplitUB-System *in planta* in Abhängigkeit von Nub. (A) Protein-Extrakte aus transformierten *N. benthamiana*-Blättern mit den Konstrukten pXA *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha, bzw. pXA NtCDPK2-Cub-Dha wurden mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. R = Reporterbande, 24 kDa; ■ = Gesamtprotein-Bande der Konstrukte bei 100 kDa. (B) Die Spaltungseffizienz wurde über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Zusätzlich zu den Daten aus A wurden Spuren eines weiteren, nicht gezeigten Western-Blots mit einbezogen, die Werte gemittelt und der Standardfehler dargestellt.

Zudem sollte in einem anschließenden Western-Blot der Einfluss der absoluten Banden-Intensitäten auf die berechnete Spaltungs-Effizienz untersucht werden. Hierzu wurden jeweils 5 μ l bzw. 15 μ l des aus dem vorangegangenen Experiment erhaltenen Protein-Extrakts mit *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha mehrfach nebeneinander auf ein SDS-Gel aufgetragen. Teile des Western-Blots wurden nachfolgend 2 min, 6 min oder 18 min entwickelt und die Spaltungs-Raten ermittelt. Die Auswertung ergab nur geringe Unterschiede zwischen Spuren mit 5 μ l bzw. 15 μ l von ca. 2% (Daten nicht gezeigt).

Um weiterhin den Einfluss der Kinase-Aktivität auf die Gesamt-Konformation von NtCDPK2 zu untersuchen, wurde eine Mutation im aktiven Zentrum eingeführt (D241A, s. auch Abb. 6), aus welcher eine Kinase-inaktive Enzymform resultiert (Ludwig *et al.*, 2005). Zunächst sollte wiederum eine biologische Funktion in Form des Zelltod-Phänotyps überprüft werden. Bei der transienten Expression in *N. benthamiana* war die Aktivität des in J mutierten Konstrukts als Zelltod in Form von bräunlichen Flecken zu erkennen, der wie zu erwarten in der Kinase-inaktiven Form nicht auftrat (Daten nicht gezeigt). Nach Trypanblau-Färbung von Blatt-Proben wurde dieser Unterschied noch deutlicher (s. Abb. 30, A). Zudem konnte eine Quantifizierung der Luminanz (s. Methoden, 6.7.3) auch den schwach sichtbaren Unterschied zwischen Wildtyp und Kinase-inaktiver Version (D241A) hervorheben (s. Abb. 30, B).

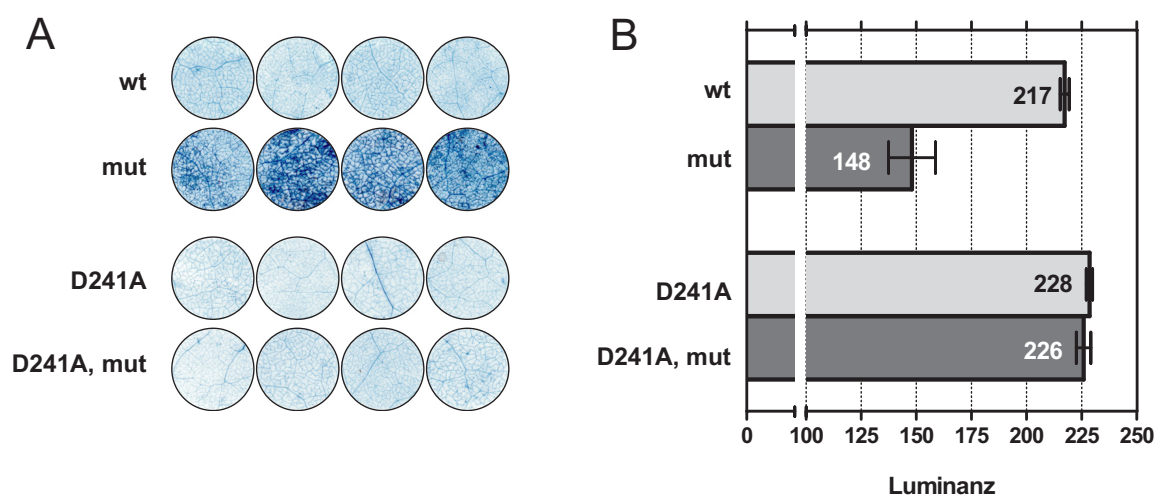


Abb. 30: Zelltod-Symptome nach Trypanblau-Färbung in Abhängigkeit von J und K. (A) Nach transienter Expression von SplitUB-Konstrukten von NtCDPK2 (pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha; wt = Wildtyp, mut = in J mutierte Version, D241A = Kinase-inaktive Form) in *N. benthamiana* wurden die Pflanzen zwei Tage mit Hochlicht bestrahlt. Blattproben wurden anschließend mit Trypanblau gefärbt, um den Zelltod zu verdeutlichen. Der Durchmesser der Blattproben beträgt ca. 1 cm. (B) Mit Adobe® Photoshop® wurde die Luminanz (arbiträre Einheiten) der Blatt-Scheiben aus A bestimmt (s. Methoden, 6.7.3), aus den vier Proben gemittelt und der Standard-Fehler angegeben.

Die Western-Blot-Analyse der Protein-Extrakte eines weiteren Experiments mit identischen Konstrukten lies keinen Unterschied von Kinase-inaktiver Form zum Wildtyp *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha erkennen. Die Spaltungs-Effizienzen lagen für beide Formen bei ca. 56% (s. Abb. 31). Hingegen zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Raten der Jmut-Versionen, für die der Wildtyp ebenso wie die Kinase-inaktive Variante einen Wert von 56% aufweist. Wie in nachfolgender Abbildung zu erkennen ist, kann aufgrund der schwach erkennbaren Banden des Gesamt- und Reporter-Proteins die Spaltungs-Rate für das in J mutierte NtCDPK2-Konstrukt nur schwer quantifiziert werden. Dieser Wert stellt dementsprechend lediglich einen Anhaltspunkt dar, lässt jedoch den Schluss zu, dass die Kinase-Aktivität des Enzyms einen Einfluss auf die Interaktions-Rate und somit die Konformation der CDPK haben könnte.

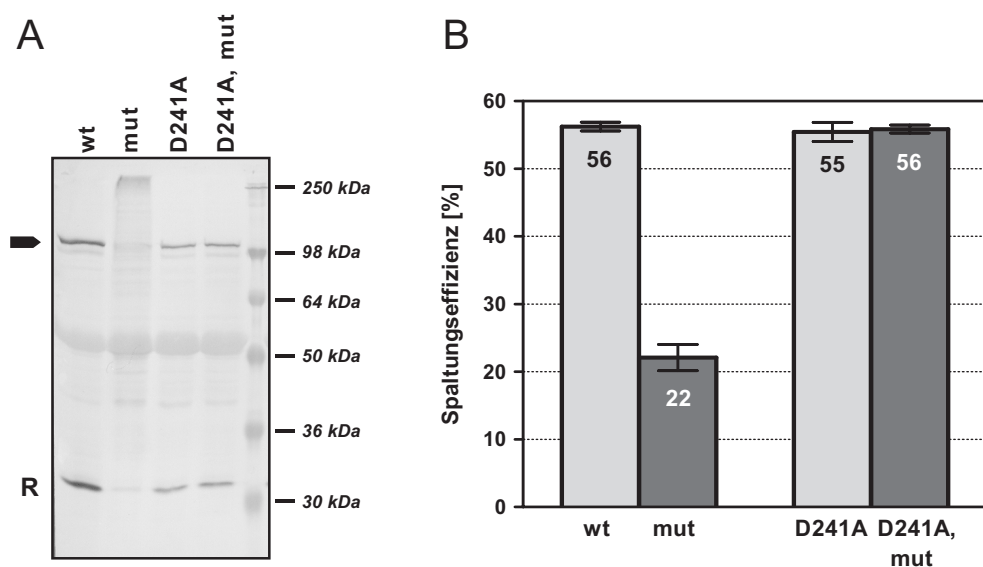


Abb. 31: Abhängigkeit der Spaltungs-Raten von der Kinase-Aktivität im SplitUB-System *in planta*. (A) Protein-Extrakte von Proben transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter mit den Konstrukten pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha, bzw. D241A wurden mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. wt = Wildtyp; mut = in J mutierte Form; R = Reporterbande, 24 kDa; \blacktriangleright = Gesamtprotein-Bande, 100 kDa. (B) Die Spaltungseffizienz wurde über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Es wurde über die gezeigten Spuren sowie über hier nicht aufgeführte Spuren gemittelt (6-8 je Konstrukt) und der Standardfehler dargestellt.

Die Stress-abhängige Aktivierung von NtCDPK2 geht auch einher mit Phosphorylierungen des Enzyms, die sowohl durch Auto-Phosphorylierung als auch durch eine in der Signalkette höher stehende Kinase katalysiert werden. Einige der beteiligten Aminosäuren, die sich auch durch eine Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität zeigen (Shift), konnten durch Massen-Spektroskopie identifiziert werden (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Hierbei

zeigte die Gel-Auftrennung nach Mutation der zwei Aminosäuren zu Alanin ein Laufverhalten wie im Grundzustand des Enzyms. Hingegen führte die Mutationen nach Aspartat zu einem vollständigen Shift von NtCDPK2. Da somit von einem Einfluss dieser Phosphorylierungen auf die Konformation des Proteins auszugehen war, wurden die entsprechenden Mutationen in dieser Arbeit in das SplitUB-Konstrukt pXCAG-Strep *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha eingeführt. Ein signifikanter Unterschied in der Spaltungsrate, abhängig von oben genannten Aminosäuren, war jedoch auch nach Stress-Stimulus durch Infiltration von H₂O nicht detektierbar. Hierbei konnte lediglich ein nicht-signifikanter Rückgang bei den DD-Konstrukten (ca. 41-42%) gegenüber den AA-Versionen (ca. 46%) beobachtet werden (s. Abb. 32, B).

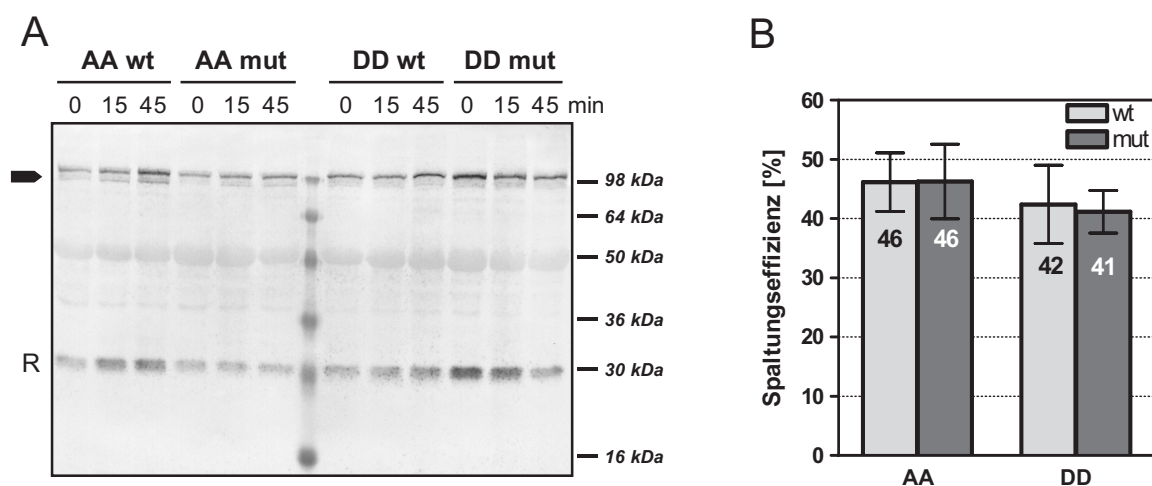


Abb. 32: Einfluss von Mutationen der Phosphorylierungs-Stellen in NtCDPK2-SplitUB-Konstrukten. (A) Protein-Extrakte von Proben transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter mit den Konstrukten pXCAG-Strep *Nub-NtCDPK2(AA bzw. DD)-Cub-Dha wurden mittels Western-Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert. wt = Wildtyp NtCDPK2; mut = in J mutierte Form; R = Reporterbande, 24 kDa; \blacktriangleright = Gesamtprotein-Bande, 100 kDa. (B) Die Spaltungseffizienz wurde über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Es wurde über die gezeigten drei Spuren eines Konstrukts sowie den gleichen Datensatz eines weiteren Western-Blots gemittelt und der Standardfehler dargestellt.

Nachfolgend wurden verschiedene Mutationen in den Phosphorylierungs-Stellen (AA, DD), der J-Domäne (wt, mut) und der Kinase-Domäne (D241A) miteinander kombiniert und ihr Einfluss auf die Konformation von NtCDPK2 untersucht. Aufgrund starker Streuung der Spaltungs-Werte und zu geringer statistischer Absicherung waren Unterschiede jedoch nicht definitiv nachzuweisen. Die Spaltungs-Effizienzen lagen überwiegend ohne erkennbare Tendenzen zwischen 60% und 75%. Allein die ausschließlich in J mutierte Form von NtCDPK2 wies eine deutlich geringere Spaltungs-Effizienz auf (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde die Auswirkung der Ca²⁺-Komplexierung durch die EF-Hände der CLD in NtCDPK2 untersucht. Für die isolierte, rekombinante CLD-Domäne

von CDPK α aus Sojabohne konnte bereits mittels „Nuclear Magnetic Resonance“ (NMR) eine Calcium-abhängige Konformations-Änderung nachgewiesen werden (Weljie und Vogel, 2004). Um die Apo-Form der CDPK nachzustellen, sollten zur Verringerung der Calcium-Affinität die z-Positionen der chelatisierenden Schleifen von Glutamat zu Glutamin mutiert werden (s. Abb. 3, s. Abb. 33). Für eine derartige Mutation in den EF-Händen #2 (E85Q) und #3 (E121Q) des Recoverins aus Rind (*Bos taurus*) konnte eine um den Faktor 1000 verringerte Affinität des Proteins gegenüber Calcium erreicht werden (Strynadka und James, 1989; Senin *et al.*, 2002). Auch das Arabidopsis-Enzym AtCPK23 weist an der genannten Position in EF-Hand #1 ein Glutamin auf, stimmt somit nicht mit der Konsensus-Sequenz für EF-Hände überein und wird folglich nicht als funktional erkannt (Programm PROSITE, <http://www.expasy.org/prosite>; Bairoch und Bucher, 1994).

	α -Helix	Schleife	α -Helix
Konsensus	En**nn**	nX*Y*ZG#Ix**z	n**nn*n
NtCDPK2-EF#1	GLKEMFRM	IDTDNSGQITFEE	LKVGLKR
NtCDPK2-EF#2	EIYDLMQA	ADVDNSGTIDYGE	FIAATLH
NtCDPK2-EF#3	HLFAAFSY	FDKDGSGYITADE	LQQACEE
NtCDPK2-EF#4	HLEDMIRD	ADQDNDGRIDYNE	FVAMMQK
AtCPK23-EF#1	GLKTLFAN	MDTNRSGTITYEQ	LQTGLSR
BtRc-EF#2	YAQHVFRS	FDANSDGTLDfKE	YVIALHM
BtRc-EF#3	KLEWAFSL	YDVDGNGTISKNE	VLEIVTA

Abb. 33: Sequenzvergleich von EF-Händen. Aminosäure-Sequenzen sowohl der vier EF-Hände von NtCDPK2, der EF-Hand #1 von AtCPK23 aus *A. thaliana* als auch der EF-Hände #2 und #3 des Recoverins aus Rind (*Bos taurus*, BtRc) werden mit der EF-Hand-Konsensus-Sequenz (s. Abb. 3) verglichen. Grau hinterlegt = konserviertes Glutamat an Position z, welches bei AtCPK23 durch Glutamin ersetzt ist und dessen Mutation zu Glutamin im Recoverin eine Calcium-Bindung verhindert (Strynadka und James, 1989; Senin *et al.*, 2002).

Die Mutation der EF-Hände #3 (E514Q) und #4 (E548Q) in den SplitUB-Konstrukten von NtCDPK2 führte zu einer signifikant gesteigerten Abspaltung des Reporters von 57% im Vergleich zum Wildtyp mit 49% (s. Abb. 34), weshalb von einer „geschlosseneren“ Konformation der mutierten Version auszugehen ist.

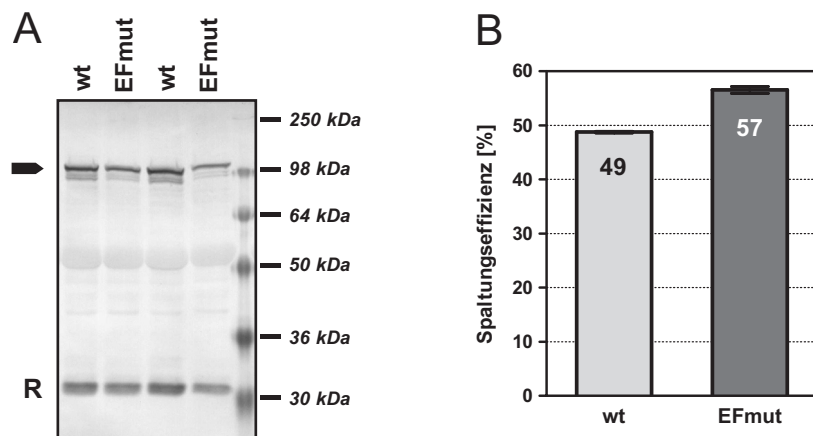


Abb. 34: Spaltungs-Raten in Abhängigkeit der Funktionalität der EF-Hände. (A) Western-Blot mit anti-HA-Antikörper von Protein-Extrakten transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter mit den Konstrukten pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha in Wildtyp-Form (wt) und mit Mutationen in den EF-Händen #3 und #4 (EFmut). R = Reporterbande, 24 kDa; ■ = Gesamtprotein-Bande, 100 kDa. (B) Die Spaltungseffizienz wurde über das Computer-Programm Image Quant bestimmt. Es wurde über zwei Spuren eines Konstrukts gemittelt und der Standardfehler dargestellt.

Zur weiteren Untersuchung der biochemischen Aktivierung von NtCDPK2 sowie der damit einhergehenden, postulierten Konformations-Änderung wurden unterschiedliche Stress-Stimuli in Pflanze getestet. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist NtCDPK2 nicht ausschließlich durch biotische Stimuli wie der rassenspezifischen Resistenz (Cf-9/Avr9, Gen-für-Gen-Interaktion), sondern auch durch den abiotischen Stimulus des hypo-osmotischen Schocks nach Infiltration von H₂O aktivierbar (Romeis *et al.*, 2001).

Diese Experimente in *N. benthamiana* zeigten jedoch sowohl bei Koexpression von Cf-9 und Elizitierung mit Avr9 als auch nach hypo-osmotischen Schock keine detektierbare Veränderung in der Spaltungs-Rate der SplitUB-Konstrukte (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abb. 28, Abb. 32). Daher wurden die Fusions-Proteine im Cf-9-transgenen Tabak exprimiert. Auch bei Verwendung dieses homologen Systems konnte nach Infiltration des Gen-für-Gen-Elizitors Avr9 keine deutliche Beeinflussung der Spaltungseffizienz nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem war die Expressions-Stärke im Vergleich zu *N. benthamiana* deutlich geringer, da in *N. tabacum* der Silencing-Inhibitor p19 die Expressions-Rate nicht steigern konnte.

Wie bereits durch Witte *et al.* gezeigt werden konnte, besteht eine weitere Möglichkeit zur dauerhaften Aktivierung von NtCDPK2 in der Infiltration des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Aufgrund dieser Kenntnisse sollte in

einem weiteren Experiment der Einfluss von Cantharidin auf die NtCDPK2-Konformation untersucht werden. Im SplitUB-System war hierbei im Wildtyp eine geringe Zunahme der Abbaubande zwei Stunden nach der Injektion von Cantharidin erkennbar, womit auf eine Stimulus-abhängige Konformations-Änderung der CDPK geschlossen werden kann.

Im Fall des in J mutierten NtCDPK2-Konstrukts zeigte dieses Experiment eine schwache Expression, weshalb die Banden des Gesamt- und Reporter-Proteins nur schwer quantifiziert werden konnten und die nachfolgend aufgeführten Werte nur einen Hinweis auf die wirkliche Spaltungs-Rate zulassen (s. Abb. 35, B). Jedoch war auch bei NtCDPK2mut in Analogie zum Wildtyp zwei Stunden nach Cantharidin-Behandlung eine leichte Abbaubande erkennbar (s. Abb. 35, A).

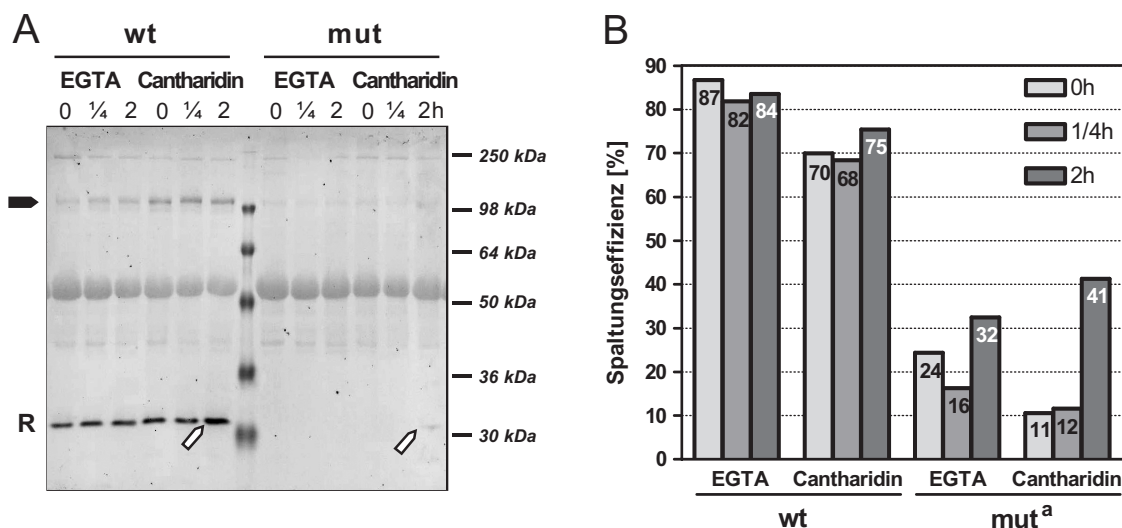


Abb. 35: Stimulus-abhängige Konformations-Änderungen von NtCDPK2. (A) SplitUB-Konstrukte pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha in wt- oder Jmut-Version wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert. Vor bzw. 1/4 h und 2 h nach Injektion von 10 mM EGTA oder 100 µM Cantharidin wurden Blattproben genommen. Protein-Extrakte wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und SplitUB-Konstrukte mit anti-HA-Antikörpern im Western-Blot detektiert. wt = Wildtyp NtCDPK2-Konstrukt; mut = in J mutiertes Konstrukt; R = Reporterbande, 24 kDa; ■ = Gesamtprotein-Bande der Konstrukte bei 100 kDa; □ = Zunahme an Reporter nach zwei Stunden. (B) Quantitative Auswertung mittels Image Quant; a = Werte nicht deutlich sichtbarer Reporter-Banden.

2.4 Konformationen von AtCRY2 *in planta*

Mit dem SplitUB-System *in cis* konnte für NtCDPK2 lediglich eine schwache Stimulus-abhängige Änderung in der Spaltungs-Effizienz des Dha-Reporters gezeigt werden. Deshalb wurde das System zur Detektion von *in vivo*-Konformations-Änderungen zusätzlich an einem weiteren Protein, dem UV-A/Blaulicht-Rezeptor Cryptochrom 2 aus *A. thaliana* (AtCRY2), erprobt.

Für Cryptochrom wird bereits in einem Modell eine Konformations-Änderung nach Licht-Perzeption postuliert, da die Expression des C-Terminus in einer *Cry1/Cry2*-Doppelmutante zu einer Licht-unabhängigen De-Etiolierung führt (s. Abb. 8; Yang *et al.*, 2000).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Batschauer (Philipps-Universität Marburg) wurden zwei Versionen des Cryptochroms 2 in die SplitUB-Vektoren kloniert. Diese unterschieden sich in der C-terminalen Aminosäure an Position 612. An dieser Stelle weisen Datenbanken (GenBank, National Center for Biotechnology Information NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vorrangig für die Proteinsequenzen des AtCRY2 ein Lysin aus, wohingegen die durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Batschauer verwendete Variante ein Glutamin besitzt (Hoffman *et al.*, 1996). Da jedoch bereits wenige Mutationen im C-Terminus des Proteins Fpr1p (Fpr1pMC) zu einer deutlich veränderten Konformation im SplitUB-System in Hefe führen (s. Abb. 24 und Raquet *et al.*, 2001), wurde auch die Q612K-mutierte Version des AtCRY2 analysiert.

In einem ersten Experiment sollten nach transienter Expression der SplitUB-Konstrukte in *N. benthamiana* die Effekte unterschiedlicher Licht-Stimuli untersucht werden. Hierzu wurden die Pflanzen zunächst im Gewächshaus im normalen Tag/Nacht-Rhythmus kultiviert und nach Probennahme in Dunkel-Bedingungen transferiert. Eine weitere Blattprobe wurde jeweils nach 30-minütigem Dunkel-Stimulus genommen. Die Auswertung der Western-Blots ergab einen geringfügigen Unterschied in der Spaltungs-Rate der beiden Varianten untereinander, nach Dunkel-Stimulus war jedoch keine signifikante Änderung erkennbar (s. Abb. 36).

Darüber hinaus wurden *N. benthamiana*-Pflanzen für 16 h abgedunkelt und anschließend Proben vor und nach 30-minütiger Belichtung mit Tageslicht entnommen. Die Immuno-Detektion zeigte für beide Varianten des Cryptochroms eine deutliche Steigerung der Spaltungs-Effizienz nach Belichtung. Im Wildtyp-Konstrukt lag die Rate bei 38% vor bzw. 47% nach Licht-Stimulus. In der Q612K-Variante konnte mit 50% vs. 53% eine signifikante jedoch geringere Steigerung detektiert werden. Zudem war in diesem Versuch ein elektrophoretischer Shift des Gesamt-Konstrukts nach Licht-Stimulus zu erkennen (s. Abb. 37).

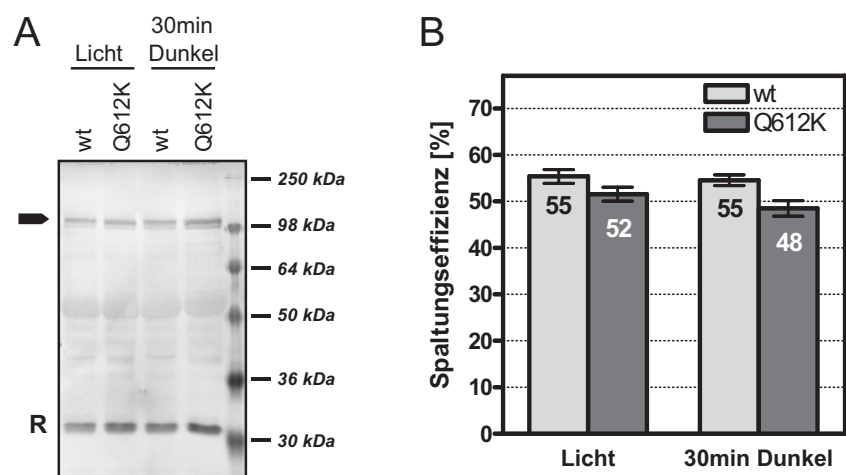


Abb. 36: Konformations-Änderungen von CRY2 nach Dunkel-Stimulus. (A) Das Konstrukt pXS Nub-Cry2-Cub-Dha (wt oder Q612K) wurde transient in *N. benthamiana* transformiert. Den Pflanzen wurden nach drei Tagen im Gewächshaus Proben entnommen, sie wurden 30 min in Dunkel-Bedingungen gestellt und es wurden erneut Proben genommen. Die entsprechenden Protein-Extrakte wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit anti-HA-Antikörper immunlokalisiert. R = Reporterbande, 24 kDa; \blacksquare = Gesamtprotein-Bande der Konstrukte bei ca. 102 kDa. (B) Quantitative Auswertung der Spaltungseffizienz mit Image Quant. Fehlerbalken stellen den Standard-Fehler der Werte von drei Bildern dar, die während der Entwicklung des Western-Blots eingescannt wurden.

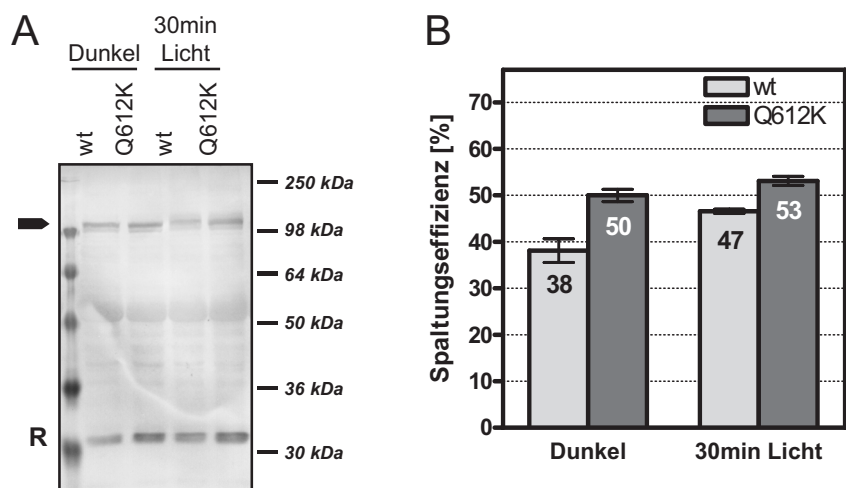


Abb. 37: Konformations-Änderungen von CRY2 nach Licht-Stimulus. (A) Mit dem Konstrukt pXS Nub-Cry2-Cub-Dha (wt oder Q612K) transient transformierte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden zwei Tage im Gewächshaus kultiviert und anschließend für 16 h in Dunkel-Bedingungen gestellt. Vor sowie nach anschließender 30-minütiger Belichtung der Pflanzen wurden Blattproben gezogen und die entsprechenden Protein-Extrakte auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot wurden die SplitUB-Konstrukte mittels anti-HA-Antikörper detektiert. R = Reporterbande, 24 kDa; \blacksquare = Gesamtprotein-Bande der Konstrukte bei ca. 102 kDa. (B) Quantitative Auswertung der Spaltungseffizienz mit Image Quant. Fehlerbalken stellen den Standard-Fehler der Werte von drei Bildern dar, die während der Entwicklung des Western-Blots eingescannt wurden.

2.5 „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC)

Für einen weiteren direkten Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Pflanze konnte das System des „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC) etabliert und mittels transienter Expression in *N. benthamiana*-Blättern angewandt werden. Verschiedene Domänen von NtCDPK2 (VK, VKJ, VKJmut, J, CLD) wurden hierzu in die binären Vektoren pSPYNE und pSPYCE kloniert (bereitgestellt von Prof. Dr. K. Harter, Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen). Diese enthielten als zu fusionierende ORFs ein c myc-Epitoptag und die 155 N-terminalen Aminosäuren von YFP (pSPYNE) bzw. ein HA-Epitoptag und die 84 C-terminalen Aminosäuren (pSPYCE). Als Kontrolle diente der bZIP-Transkriptions-Faktor AtCPRF2 aus *A. thaliana*, von dem bekannt ist, dass er dimerisiert und eine Interaktion der YFP-Fragmente im BiFC System in anderen Organismen und Zelltypen zeigt (Walter *et al.*, 2004). Die Expression der BiFC-Fusions-Konstrukte konnte mittels Western-Blot anhand der HA- bzw. c myc-Epitoptags bestätigt werden. Jedoch waren Fragmente wie die YFP-Hälften oder deren Fusionen mit J aufgrund ihrer geringen Größe nicht eindeutig zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Zur Etablierung des Systems wurden zunächst die Kontrollen mikroskopisch untersucht. Hierbei war im Fluoreszenz-Mikroskop die Homodimerisierung des bZIP-Transkriptions-Faktors AtCPRF2 deutlich im Zellkern zu lokalisieren (s. Abb. 38, A). Außerdem konnten innerhalb des Kerns stark fluoreszierende Strukturen („nuclear speckles“) beobachtet werden. Diese Fluoreszenz war bei Expression nur eines der Konstrukte oder Koexpression von AtCPRF2-NYFP mit CYFP nicht detektierbar (s. Abb. 38, C, D). Bei Koexpression des NYFP ohne Fusionsprotein mit dem an CYFP fusionierten Transkriptionsfaktor ließ sich allerdings eine Hintergrund-Fluoreszenz im Zellkern detektieren (s. Abb. 38, B). Diese war jedoch deutlich schwächer als im Fall der Koexpression von AtCPRF2-NYFP mit AtCPRF2-CYFP und zeigte keine weiteren Strukturen innerhalb des Kerns (Daten nicht gezeigt).

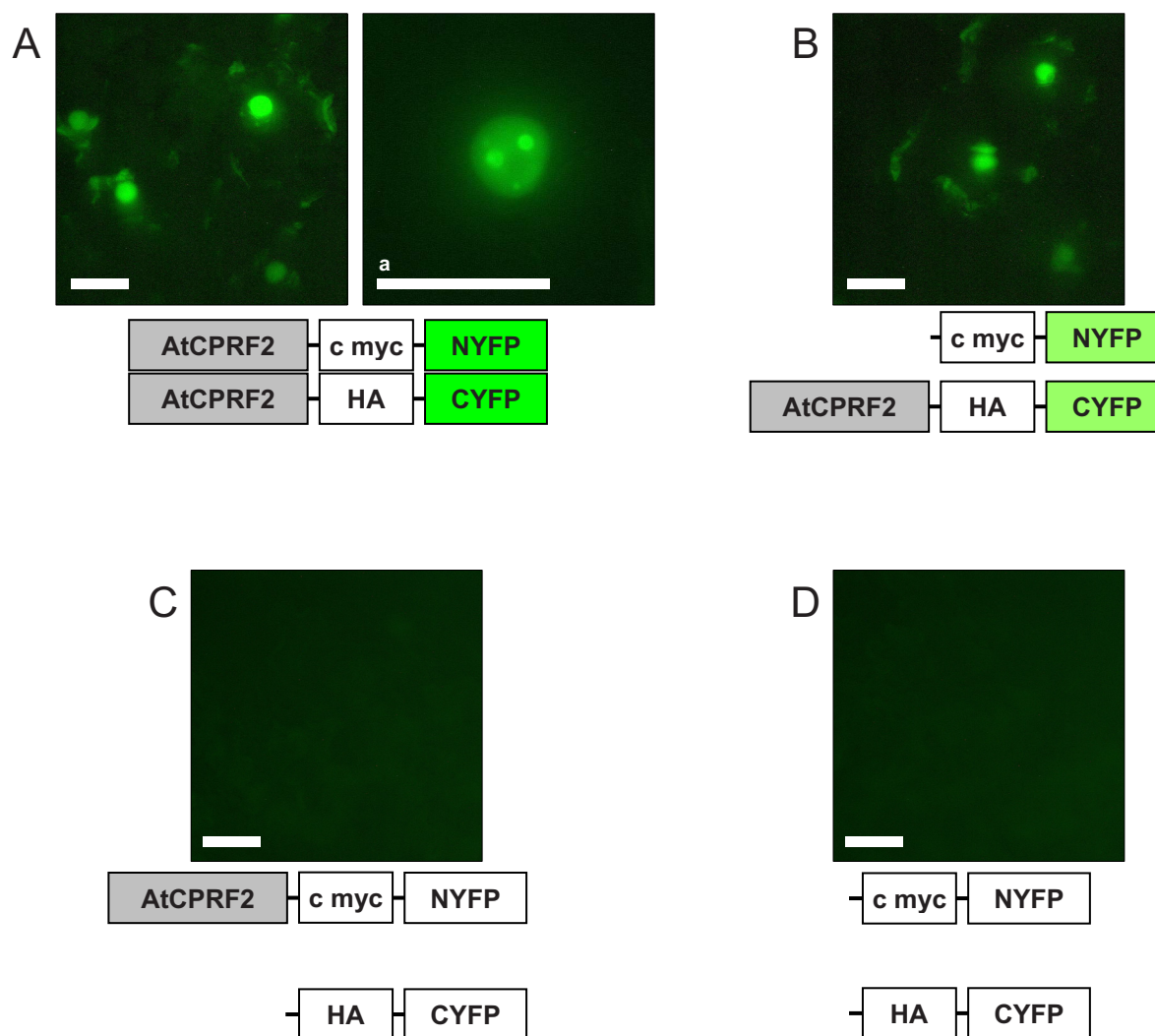


Abb. 38: AtCPRF2-Interaktionen mit BiFC in *N. benthamiana*. Nach transienter Koexpression von BiFC-Konstrukten in *N. benthamiana* wurden Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen gemacht. Darunter sind jeweils die exprimierten Konstrukte angegeben. Deren Abstand stellt den Grad der Interaktion dar, die Färbung der YFP-Fragmente die Fluoreszenz-Intensität. Weiße Balken entsprechen 50 μm. a = Vergrößerung eines Zellkerns.

Zur Analyse von Domänen-Interaktionen wurden die NtCDPK2-Konstrukte VK, VKJ, VKJmut, J und CLD jeweils mit NYFP bzw. CYFP fusioniert. Dabei war bereits bei einer Kontroll-Kombination eine Hintergrund-Fluoreszenz nach Fusion der Domänen mit CYFP und der Koexpression mit nicht-fusioniertem NYFP vorhanden. Dieser Hintergrund ließ sich nicht signifikant von der Fluoreszenz bei Koexpression zweier Fusionsproteine unterscheiden. VKJ, VKJmut und VK waren in verschiedenen Kombinationen im Bereich der Zellmembran und in cytosolischen Strängen als kleinere, teils bewegliche Vesikel zu finden (s. Abb. 39, A). Dies korreliert mit Studien am Gesamt-Protein von NtCDPK2-GFP, die ebenfalls eine Lokalisation des Konstrukts in Vesikeln zeigten (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Außerdem ließen sich wie nachfolgend abgebildet schwach im Cytosol leuchtende Zellen auffinden (s. Abb. 39, B). Teilweise war auch eine Interaktion im Bereich des Zellkerns zu

erkennen (s. Abb. 39, C). Durch wiederholte Experimente mit diversen Kombinationen von NYFP- mit CYFP-Fusionen konnten keine einheitlichen Lokalisationen reproduziert werden. Während z.B. NtCDPK2(VKJ)-NYFP und NtCDPK2(CLD)-CYFP im Bereich des Nukleus lokalisiert fluoreszierten, war dieser Zustand im reziproken Versuch nicht erkennbar (vgl. Abb. 39, B, C). Wie Tabelle 1 zeigt, konnte bei der Expression von VKJ-CYFP unabhängig vom koexprimierten Konstrukt stets eine Lokalisierung an der Membran und im Cytoplasma sowie in teils beweglichen Vesikeln beobachtet werden. Die Expression von CLD-CYFP zeigte jedoch nur in Kombination mit VKJ-NYFP eine deutliche Fluoreszenz, was auf eine Interaktion der beiden Domänen hinweist.

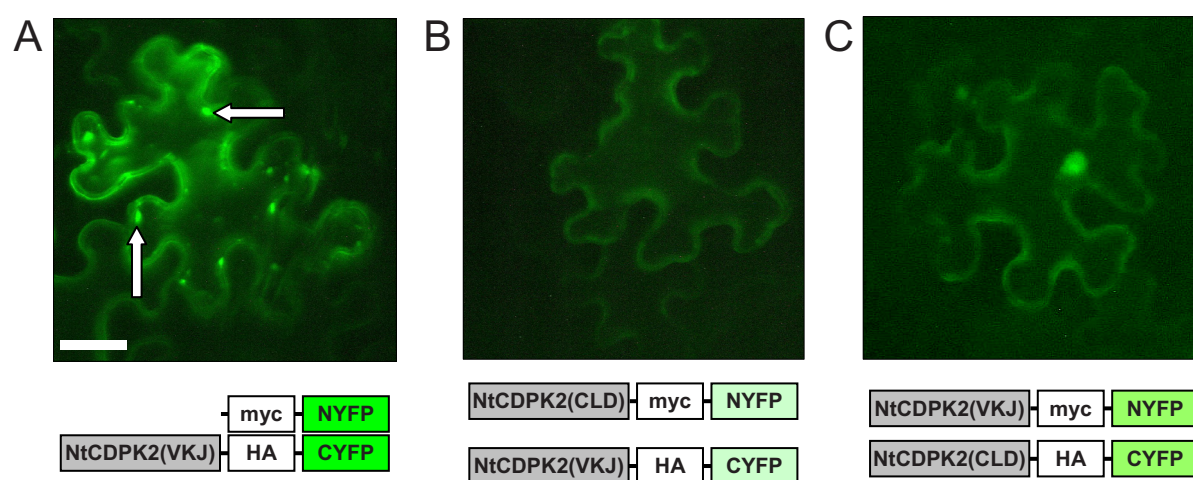


Abb. 39: NtCDPK2-Domänen-Interaktionen mit BiFC in *N. benthamiana*. Nach transienter Koexpression von BiFC-Konstrukten in *N. benthamiana* wurden Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen gemacht. Darunter sind jeweils die exprimierten Konstrukte angegeben. Deren Abstand stellt den Grad der Interaktion dar, die Färbung der YFP-Fragmente die Fluoreszenz-Intensität. Der weiße Balken entspricht 50 μm . \Rightarrow = bewegliche Vesikel.

Tab. 1: YFP-Fluoreszenz und -Lokalisierung in *N. benthamiana*-Zellen bei BiFC-Koexpression.

	CYFP	VKJ-CYFP	CLD-CYFP
NYFP	n, m, c ^a	M, C, V ^b	m, c, n
VKJ-NYFP	-	N, M, c, V	M, C, n
CLD-NYFP	-	M, C, V	-

a: N, n = Nukleus; M, m = Membran; C, c = Cytoplasma-Stränge; V = Vesikel; Großbuchstaben = deutliche Fluoreszenz; kleine Buchstaben = geringe Fluoreszenz; - = keine Fluoreszenz.
b: bewegliche Vesikel.

Die stärkste und von der Intensität den Kontrollen des Transkriptions-Faktors vergleichbare Fluoreszenz konnte bei den Konstrukten mit NtCDPK2(J)-CYFP erhalten werden, jedoch unabhängig von den koexprimierten Fusionsproteinen (NYFP, VK-NYFP, CLD-NYFP). Neben dieser Kombination zeigten sämtliche Koexpressionen schwächere Fluoreszenzen, und lassen daher zunächst auf eine nur geringe oder nicht vorhandene Interaktion der jeweiligen Domänen schließen (s. Tab. 2). Die Einzel-Expression der jeweiligen Konstrukte führte zu keiner Fluoreszenz (Daten nicht aufgeführt).

Tab. 2: YFP-Fluoreszenz bei Koexpressionen von NtCDPK2-Konstrukten in *N. benthamiana*.

	<i>CYFP</i>	<i>VKJ-CYFP</i>	<i>VKJmut-CYFP</i>	<i>VK-CYFP</i>	<i>J-CYFP</i>	<i>CLD-CYFP</i>
<i>NYFP</i>	- ^a	+/-	-	-	+	+/-
<i>VKJ-NYFP</i>	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-
<i>VKJmut-NYFP</i>	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-
<i>VK-NYFP</i>	-	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.
<i>J-NYFP</i>	-	n.b.	n.b.	+/-	n.b.	+/-
<i>CLD-NYFP</i>	-	-	-	n.b.	+	n.b.

a: + = starke Fluoreszenz; +/- = schwache Fluoreszenz; - = keine Fluoreszenz; n.b. = nicht bestimmt.

Allerdings kann nach mehreren Wiederholungen der angeführten Experimente zusammenfassend festgehalten werden, dass die Fluoreszenz-Stärke und spezifische Lokalisationen in diesem System vermutlich auch signifikant von der Expressions-Stärke der verschiedenen Konstrukte in *N. benthamiana* beeinflusst werden.

Um darüber hinaus dennoch eine mögliche Stimulus-Abhängigkeit der Interaktion von VKJ und CLD beurteilen zu können, wurde diese Interaktion unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Zunächst wurde H₂O oder CaCl₂-Lösung in die exprimierenden Blätter infiltriert. Dabei konnte keine eindeutige Veränderung in der Lokalisierung oder Stärke der Interaktion aufgezeigt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Injektion des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin beobachtet, der im Allgemeinen zu einer dauerhaften Aktivierung der CDPK führen sollte (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Hierbei konnte lediglich eine beschleunigte Abnahme der Fluoreszenz nach Infiltration von Cantharidin bei der Kombination von VKJ-CYFP und CLD-NYFP im Vergleich zu den Kontrollen mit freiem NYFP detektiert werden (s. Tab. 3). Dasselbe Ergebnis war in der reziproken Kombination VKJ-NYFP und CLD-CYFP zu finden, jedoch war hier kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle mit freiem NYFP erkennbar (s. Tab. 3).

Tab. 3: Fluoreszenz von BiFC-Koexpressionen nach Cantharidin-Stimulus^a.

<i>t</i> [min] ^b	CYFP				VKJ-CYFP				CLD-CYFP			
	0	5	15	30	0	5	15	30	0	5	15	30
NYFP	+/- ^c	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
VKJ-NYFP	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-
CLD-NYFP	-	-	-	-	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-

a: Vor und im Zeitkurs nach Infiltration von 100 μ M Cantharidin in *N. benthamiana*-Blattproben, die Kombinationen von BiFC-Konstrukten transient exprimierten, wurde die YFP-Fluoreszenz beurteilt.

b: Zeit nach Infiltration; bis 15 min aus zwei Messreihen gemittelt, bei 30 min nur eine Messreihe;

c: + = deutliche, +/- = schwächere, - = geringe Fluoreszenz.

2.6 Intramolekularer „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET)

Zur Untersuchung der Gesamt-Konformation musste das bereits in Pflanze etablierte System des „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET) angepasst werden. Ähnlich dem SplitUB-System *in cis* wurde der „*Destination*“-Vektor pXSG-NYCC entwickelt, mit dem an das mittels GatewayTM-System zu klonierende Gen ein N-terminales YFP und ein C-terminales CFP fusioniert werden kann. In diesen Vektor wurden nun NtCDPK2 und die in J mutierte Form, sowie als Kontrollen GUK1 und FPR1 kloniert. Nach transienter Transformation von *N. benthamiana*-Blättern waren bereits leichte Zelltod-Symptome auf der abaxialen Blattseite bei YFP-NtCDPK2mut-CFP im Gegensatz zum Wildtyp zu erkennen, die allerdings nicht photographisch festgehalten werden konnten. Lediglich der im Vergleich zum Wildtyp intensivere Farbunterschied zwischen infiltriertem und nicht infiltriertem Gewebe bei NtCDPK2mut lässt den stärkeren Zelltod erkennen (s. Abb. 40, A). Hingegen führte die Expression der deregulierten Variante VKJmut zum schnellen Absterben des transformierten Gewebes (s. Abb. 40, B) und lieferte damit einen eindeutigen Hinweis auf die Funktionalität der Konstrukte.

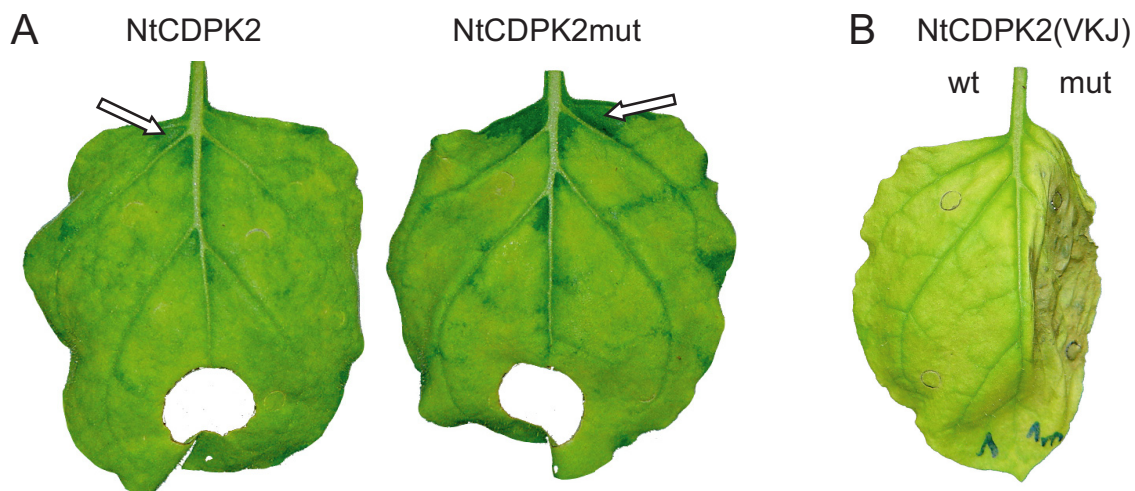


Abb. 40: Phänotypen nach transienter Expression der FRET-Konstrukte. (A) Die Fusions-Proteine YFP-NtCDPK2-CFP bzw. die in J mutierte Version wurden in unterschiedlichen Blättern von *N. benthamiana* transient exprimiert. Die Pflanzen wurden für zwei Tage mit Hochlicht bestrahlt. (B) In zwei Hälften desselben Blatts wurden YFP-NtCDPK2(VKJ bzw. VKJmut)-CFP exprimiert und wie unter A beschrieben inkubiert. Pfeile = nicht mit Agrobakterien infiltrierte Bereiche.

Im Folgenden wurden am Laserscanning-Mikroskop fluoreszierende und somit die Fusionsproteine exprimierende Zellen analysiert. Die Fluoreszenz war im Bereich des durch die Vakuole an die äußere Zellmembran gedrückten Cytosols und in Cytoplasma-Strängen zu finden. Über das Akzeptor-„Photobleaching“ gelang es YFP zu bleichen und gleichzeitig die Zunahme der CFP-Fluoreszenz zu messen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die YFP-Fluoreszenz nach dem Bleichen (s. Abb. 41, A) innerhalb der sich anschließenden Messzeit von ca. 15 s wieder auf ihr Ausgangsniveau anstieg. Eine gleichzeitige Zunahme der CFP-Fluoreszenz war im ersten Probenumfang deutlich zu detektieren (s. Abb. 41, B).

Über eine Rechner-gestützte Auswertung wurde anschließend die FRET-Effizienz bestimmt (Berechnung s. Abb. 16) und graphisch dargestellt (LSM FRET Tool). Die Daten sind exemplarisch für eine Probe von NtCDPK2 nachfolgend abgebildet und statistisch ausgewertet (s. Abb. 42; Anhang Tab. 9). Die dabei hauptsächlich in den Kontroll-Regionen auftretenden negativen Werte kommen durch eine Abnahme der CFP-Fluoreszenz evtl. durch leichtes Bleichen während der Detektion zustande und sind bereits in der Literatur beschrieben (Bhat *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2005).

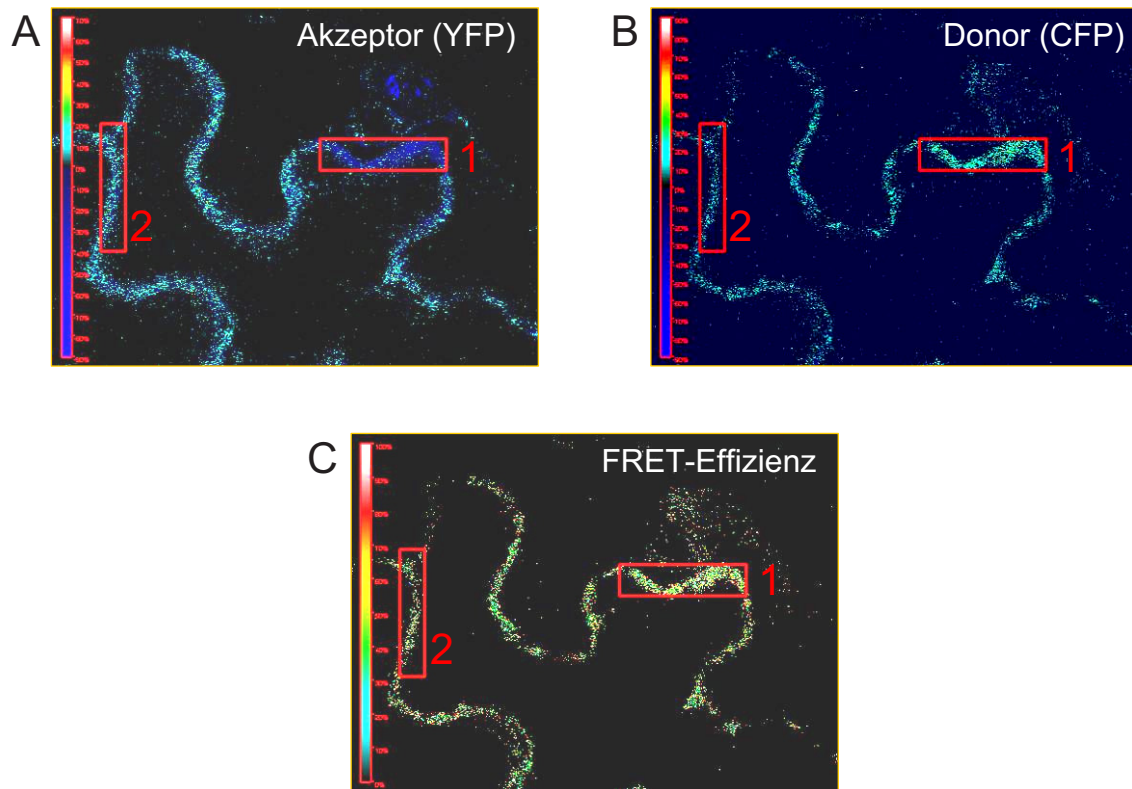


Abb. 41: Aufnahmen der Laserscanning-Mikroskopie. (A) Nach transienter Expression von YFP-NtCDPK2-CFP in *N. benthamiana* wurden Blattproben entnommen und in 25% Glycerin gebettet. Nach Lokalisierung fluoreszierender Zellen wurde Akzeptor-„Photobleaching“ im Bereich 1 durchgeführt. Region 2 = ungebleichter Kontroll-Bereich. (B) Gleichzeitig wurde die CFP-Fluoreszenz gemessen. (C) Die FRET-Effizienz wurde über das LSM FRET Tool bestimmt und graphisch dargestellt. Farbdefinitionen sind jeweils in der Skala im linken Bildrand aufgeführt.

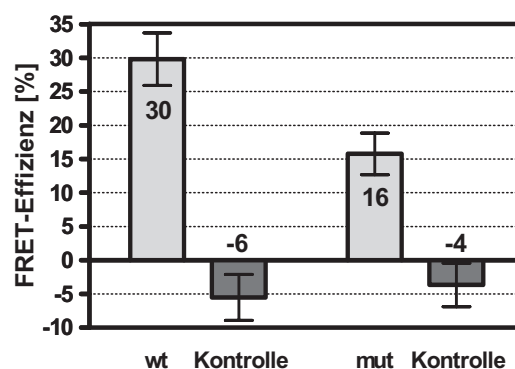


Abb. 42: FRET-Effizienzen von NtCDPK2-Konstrukten. Nach transienter Expression der Konstrukte YFP-NtCDPK2-CFP in Wildtyp (wt) und in J mutierter Version (mut) in *N. benthamiana* wurden von je drei Regionen einer Blattscheibe die FRET-Effizienzen [%] bestimmt. Die im Anhang aufgeführten Daten (s. Tab. 9) wurden gemittelt und der Standard-Fehler berechnet (Fehler-Balken). Als interne Kontrollen dienten jeweils ungebleichte Bereiche.

Die FRET-Effizienz des NtCDPK2-Wildtyp Konstrukts lag bei durchschnittlich 30%, für die in J mutierte Version nahezu halbiert bei ca. 16% (s. Abb. 42). In weiteren Messreihen sollten diese Daten bestätigt werden. Jedoch war bei gleicher Behandlung der Proben und identischen Einstellungen des Zeiss-Mikroskops das zuvor gezeigte Ergebnis für NtCDPK2 und NtCDPK2mut nicht mit jener Eindeutigkeit reproduzierbar, da die FRET-Effizienzen nur geringe Unterschiede aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Auch der Wechsel zu einem Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica, mit dem Geräte-spezifisch nicht über einen definierten Zeitraum, sondern bis auf einen gewählten Prozentsatz der ursprünglichen YFP-Intensität gebleicht wird (hier 10-20%), konnte mit dem ersten Versuch vergleichbare Ergebnisse nicht reproduzieren. Zudem war ein Akzeptor-„Photobleaching“ schwierig, da die YFP-Fluoreszenz unmittelbar nach dem Bleichen wiederhergestellt wurde. Eine mögliche Erklärung ist hierfür die hohe Mobilität der Proteine, da diese durch die N-terminale Fusion mit YFP nicht mehr myristoyliert und somit im Cytosol lokalisiert waren (Daten nicht gezeigt). Demzufolge gestaltete sich auch die Ermittlung der FRET-Effizienzen schwierig, welche Rückschlüsse auf die Konformation der Proteine zulassen könnte.

In nachfolgenden Experimenten wurden die Kontroll-Proteine Guk1p und Fpr1p mit einbezogen, wobei ebenso die zuvor genannten Schwierigkeiten auftraten. Die FRET-Effizienzen waren niedrig, so dass auf eine eher „offene“ Konformation der Proteine geschlossen werden kann, in welcher CFP und YFP weiter voneinander entfernt sind (s. Abb. 43). Die entsprechenden Daten zeigen zudem, dass das intramolekulare FRET-System nicht für alle Arten von Proteinen geeignet ist und sich FRET-Effizienzen nur zwischen Konformationen eines einzelnen, evtl. mutierten Konstrukts, nicht jedoch zwischen verschiedenen Proteinen vergleichen lassen.

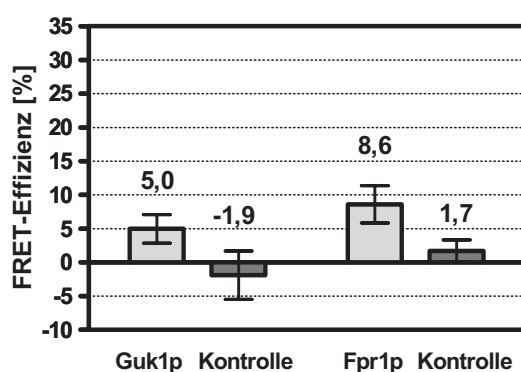


Abb. 43: FRET-Effizienzen von Guk1p- und Fpr1p-Konstrukten. Nach transienter Expression der Konstrukte YFP-Guk1p-CFP und YFP-Fpr1p-CFP in *N. benthamiana* wurden von je drei Regionen einer Blattscheibe die FRET-Effizienzen [%] bestimmt. Die im Anhang aufgeführten Daten (s. Tab. 10) wurden gemittelt und der Standard-Fehler berechnet (Fehler-Balken). Als interne Kontrollen dienten jeweils ungebleichte Bereiche. Zum besseren Vergleich wurde die Skalierung derjenigen aus Abbildung 42 angepasst.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Konformation der Calcium-abhängigen Protein-Kinase NtCDPK2 aus Tabak untersucht, um postulierte Aktivierungsmodelle für CDPKs basierend auf *in vitro*-Daten rekombinanter Enzyme *in vivo* zu überprüfen und eventuell zu bestätigen. Da bislang lediglich NMR-Strukturen der Calmodulin-ähnlichen Domäne CLD (Weljie *et al.*, 2004; Weljie und Vogel, 2004), nicht jedoch eines gesamten Proteins publiziert sind und eine Kristallisation zur Röntgenstruktur-Analyse am Beispiel der vollständigen AtCPK1 nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte (persönliche Auskunft Prof. J. F. Harper Ph.D.; University of Nevada, Reno, USA), sollten Rückschlüsse auf eine Konformation mit verschiedenen *in vivo*-Analyse-Methoden erhalten werden.

3.1 NtCDPK2 mit mutierter Junction-Domäne

Da NtCDPK2 nach adäquaten Stimuli nur transient aktiviert wird, wurden mehrere Mutationen in NtCDPK2 eingeführt, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase führen sollten. Dazu wurde zunächst die auto-inhibitorische Junction-Domäne (J) mutiert. Derartige Mutationen im Gesamtprotein einer CDPK mit anschließender *in vivo* Analyse waren bisher nicht beschrieben. Lediglich *in vitro*-Untersuchungen der in J mutierten AtCPK1 aus *A. thaliana* konnten zeigen, dass die Mutation mehrerer Aminosäuren in J in einem Ca^{2+} -unabhängigen Konstrukt ohne CLD die Enzymaktivität auf 70% der Aktivität einer vollständigen AtCPK1 steigert, ebenso wie auch das komplette Entfernen der regulatorischen Domänen J und CLD (Harper *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu zeigte das Konstrukt AtCPK1(VKJ) mit Wildtyp-J-Version lediglich basale Enzymaktivität vergleichbar mit der vollständigen CDPK ohne gebundenes Calcium.

Erste Hinweise hinsichtlich des Einflusses solcher Mutationen in J auf die biologische Aktivität *in vivo* lieferten Versuche an NtCDPK2 (T. Romeis, unveröffentlicht), in denen die Koexpression von J in Kombination mit der konstitutiv aktiven Form NtCDPK2(VK) den „*Hypersensitive Response*“-ähnlichen Zelltod in *N. benthamiana* inhibiert. Hingegen konnte der Zelltod durch Koexpression von NtCDPK2(VK) mit einem mutierten J nicht verhindert werden. Ein weiterer Hinweis auf eine Funktionalität *in vivo* wurde am Beispiel der CDPK4 aus Gerste gezeigt (Freyark *et al.*, in Vorbereitung), für die ebenso eine Inhibition der Kinase-Aktivität des VK-Konstrukts und des daraus resultierenden Zelltods nach Expression in *N. benthamiana* durch das entsprechende J gezeigt werden konnte. Versuche mit einer mutierten Junction-Domäne stehen für diese CDPK jedoch noch aus.

Die in dieser Arbeit eingeführten Mutationen im Gesamt-Protein NtCDPK2 führten zu einem deutlichen Unterschied zum Wildtyp nach transientscher Expression in *N. benthamiana*, wobei die erheblich schwächere Expression der in J mutierten Version hierbei in kausalem

Zusammenhang mit einer gesteigerten Enzym-Aktivität und der damit einhergehenden Toxizität des Konstrukts stehen könnte. Ein ähnliches Phänomen konnte bereits bei der Expression der deregulierten Version NtCDPK2(VK) beobachtet werden, die im Vergleich zum gesamten Protein ebenfalls schwächer exprimiert war (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Hinweis auf die Toxizität des Jmut-Konstrukts ist in dem verlangsamten Wachstum der mit pXCS-HAStrep NtCDPK2mut transformierten Agrobakterien-Kulturen zu finden, wie auch im Fall von NtCDPK2(VK) (Daten nicht gezeigt).

Nach transienter Expression in *N. benthamiana* war im Western-Blot ein geringfügiger Unterschied im Laufverhalten von NtCDPK2mut im Vergleich mit dem Wildtyp zu detektieren. Hierbei zeigte die mutierte Version zunächst analog zum Wildtyp einen Shift nach hypo-osmotischem Stimulus, die relativen Intensitäten der beiden Shift-Banden untereinander waren jedoch leicht verändert (s. Abb. 19). Für die untere Bande konnte bereits durch Witte *et al.* eine Phosphorylierung durch eine in der Signal-Kaskade oberhalb gelegene Kinase gezeigt werden, die obere Bande wurde hierbei durch eine Auto-Phosphorylierung verursacht (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Anhand dieser Daten ist die verstärkte untere Shift-Bande in NtCDPK2mut mit einer gesteigerten Phosphorylierung durch eine andere Kinase zu erklären, da die durch Jmut induzierte Aktivierung zugleich die räumliche Erreichbarkeit der CDPK als Substrat erleichtern könnte. Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden Phosphorylierungen voneinander unabhängig sind (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht), jedoch bleibt zu vermuten, dass beide Phosphorylierungen für eine vollständige Aktivierung notwendig sind. Untersuchungen zur Bestätigung dieser Theorie fehlen jedoch bislang.

Zur weiteren *in vivo*-Analyse von NtCDPK2mut wurde der Phänotyp nach Hochlicht-Stimulus betrachtet. Sowohl bei Tageslicht als auch unter UV-Licht war ein einsetzender Zelltod zu erkennen (s. Abb. 20). Ein weiterer Nachweis hierfür war die Färbung mit Trypanblau. Der Zelltod war allerdings nicht so ausgeprägt wie in Blättern mit VK-Version (s. Abb. 20). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Mutationen in J die CDPK nur leicht modifizieren, wobei ein gewisser Grad der Regulation noch möglich ist, und nicht analog der VK-Variante vollständig deregulieren.

Der zuvor dargestellte Zusammenhang kann eine bessere Analyse der CDPK *in vivo* und deren wirtschaftliche Anwendung im Agrarsektor ermöglichen. Hierbei könnte ein System entwickelt werden, bei dem z.B. das NtCDPK2-Gen hinter Pathogen-induzierbaren Promotoren in eine Nutzpflanze eingebracht wird, und somit in Pathogen-befallenen Bereichen eine beschleunigte Aktivierung von Abwehrreaktionen oder einem hypersensitiven Zelltod verursacht, um so die Ausbreitung des Pathogens einzuschränken.

Erste Versuche mit transgenen *A. thaliana*-Linien, die ein dereguliertes VK-Konstrukt von NtCDPK2 exprimierten, wurden bereits durchgeführt. Unter bisheriger Verwendung des konstitutiven 35S-Promotors und des ebenfalls in dieser Arbeit genutzten Ethanol-induzierbaren pAlcA-AlcR-Systems gelang es nicht, stabile Linien eines vollständig

deregulierten VK-Konstrukts zu etablieren (S. Heimstädt, T. Romeis, unveröffentlicht). Eine weniger aktive Version von NtCDPK2, wie die zuvor beschriebene in J mutierte Form, könnte den Stimulus-unabhängigen Zelltod verhindern und wäre somit gegenüber der VK-Variante zu favorisieren.

In einem ähnlichen Ansatz könnten CDPKs aus anderen Pflanzen-Arten untersucht werden. So ist für monokotyle Getreide-Arten an eine Verwendung der bereits untersuchten HvCDPK3 aus Gerste zu denken, da diese nach biolistischer Transformation der VK-Variante zu einer gesteigerten Resistenz von Gerste gegenüber verschiedenen pathogenen Pilzen führt (Freymark *et al.*, in Vorbereitung). Jedoch ist auch in diesem System der in *A. thaliana* beobachtete systemische Zelltod bei Überexpression zu erwarten, weshalb die Nutzung einer in J mutierten, nur partiell deregulierten Variante vorteilhaft wäre.

3.2 Interaktionen von NtCDPK2-Domänen *in trans*

In zwei Systemen, in Hefe sowie in Pflanze, wurde zunächst die Interaktion einiger Domänen von NtCDPK2 *in trans* untersucht. Folgend einem postulierten Modell (Romeis *et al.*, 2001; Freymark *et al.*, in Vorbereitung) sollte die Kinase-Domäne mit der Junction-Domäne im inaktiven Zustand des Enzyms interagieren und dementsprechend die Kinase-Aktivität hemmen (s. Abb. 5). Diese auto-inhibitorische Funktion von J konnte bereits für AtCPK1 aus *A. thaliana* (Harper *et al.*, 1994) und CDPK α aus Sojabohne (Harmon *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Es wurde daher auf eine direkte Interaktion jener Domänen geschlossen. Darüber hinaus gelang es Harmon *et al.* die Interaktion einer Junction-Domäne von CDPK α mit der entsprechenden CLD *in vitro* nachzuweisen (Harmon *et al.*, 1994), welche für einen aktivierten Zustand des Enzyms postuliert wird.

3.2.1 SplitUB in Hefe, *in trans*

Mithilfe des SplitUB-Systems in Hefe sollten diese Interaktionen *in vivo* am Beispiel von NtCDPK2 nachgewiesen werden. Domänen-Interaktionen konnten jedoch *in trans* weder zwischen VK und J noch zwischen J und CLD gezeigt werden (s. Abb. 21). Eine mögliche Ursache kann in einer geringen Affinität der Domänen zueinander liegen, die einen Nachweis der Interaktion mit diesem System in Hefe nicht zulässt.

Für eine Interaktion *in trans* zwischen rekombinanten Formen von J und CLD wurde bereits eine niedrige Affinität mit einer Bindungs-Konstante von ca. 7 μ M für verschiedene CDPKs nachgewiesen (Huang *et al.*, 1996; Yoo und Harmon, 1996). Ein postulierter Grund hierfür liegt in der räumlichen Nähe der Domänen im nativen Enzym. Somit weisen diese eine lokal

erhöhte Konzentration auf und benötigen daher nur eine geringe Affinität für eine Bindung (Weljie *et al.*, 2003). Entsprechend ist auch der fehlende Nachweis einer Interaktion zwischen VK und J zu deuten.

Außerdem könnte im heterologen System sowohl die Faltung der Proteine im Allgemeinen als auch der nur 31 Aminosäuren umfassenden Junction-Domäne im Speziellen fehlerhaft sein. Weiterhin ist denkbar, dass die Annäherung der Ubiquitin-Hälften zueinander sterisch gestört ist und somit eine Interaktion *in trans* behindert wird. Eine Fusion von Nub und Cub am jeweils anderen Ende der CDPK-Domänen (N- bzw. C-Terminus) könnte hier nähere Aussagen zulassen.

Darüber hinaus wurde bereits *in vitro* nachgewiesen, dass andere Faktoren durch die Bindung an J dessen Interaktion mit der CLD behindern können. Hierzu konnten Harper *et al.* nachweisen, dass die Aktivität einer VKJ-Version der AtCPK1 durch die Zugabe eines anti-J-Antikörpers um 87% gesteigert werden kann, da dieser an die Junction-Domäne bindet und so deren Interaktion mit K inhibiert (Harper *et al.*, 1994).

Ebenfalls konnten Weljie *et al.* zeigen, dass die Struktur der CLD nicht derjenigen der meisten Calmoduline wie z.B. des Menschen (>40% Sequenz-Homologie mit CLDs) entspricht, sondern eher der Struktur des Hefe-Calmodulins ähnelt (Yoshino *et al.*, 1996; Weljie *et al.*, 2003). Daher könnte das Hefe-CaM im hier untersuchten SplitUB-System an J binden und so eine Interaktion mit der CLD verhindern.

Eine weitere Ursache für den fehlenden Nachweis von Domänen-Interaktionen in Hefe kann die Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration sein. Bereits Harmon *et al.* zeigten im Fall der Interaktion zwischen der Junction-Domäne von CDPK α sowohl mit der entsprechenden CLD als auch mit CaM den Einfluss der Calcium-Bindung an die jeweiligen EF-Hände *in vitro*. Mit steigender Calcium-Konzentration erhöhte sich die Bindungsaffinität der Junction-Domäne an CLD bzw. Calmodulin (Harmon *et al.*, 1994). Somit könnte im vorliegenden SplitUB-System eine nicht detektierbare Interaktion zwischen J und CLD auch aus einer zu niedrigen Calcium-Konzentration in den untersuchten Hefe-Zellen resultieren.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Interaktion zwischen NtCDPK2(J) und HvCaM3 im SplitUB-System (s. Abb. 21) bestätigt darüber hinaus *in vitro*-Daten von CDPK α (J) und Calmodulin (Harmon *et al.*, 1994). Ein Grund für diesen gelungenen Nachweis im Gegensatz zur Interaktion mit NtCDPK2(CLD) kann in der geringeren Substrat-Spezifität des untersuchten Calmodulins HvCaM3 liegen. So wurde bereits postuliert, dass diese verringerte Spezifität und höhere Flexibilität für die Bindung unterschiedlicher CaM-Substrate notwendig ist (Chou *et al.*, 2001). Zudem liegt die Substrat-Bindungskonstante verschiedener Calmoduline allgemein im nanomolaren Bereich (Crivici und Ikura, 1995). Bei CLDs wurden hingegen ca. 7 μ M für die J-Bindung gemessen. Daher und aufgrund dessen, dass die Substrat-Bindung nur nach Ca²⁺-Komplexierung zustande kommt, ist die Interaktion zwischen J und HvCaM3 zu begründen.

Diese Erklärung wird durch experimentelle Untersuchungen gestützt, die eine schwächere Interaktion der mutierten J-Domäne mit HvCaM3 als der Wildtyp zeigten (s. Abb. 21). Obwohl diese Mutationen in Aminosäuren gewählt wurden, für die eine Interaktion mit Calmodulin bzw. in diesem Fall mit der CLD als nicht essentiell postuliert wird, ist dennoch ein Unterschied in der Gesamt-Konformation in Jmut wahrscheinlich, da mehrere in der Sequenzfolge benachbarte Aminosäuren mutiert wurden (s. Abb. 17, Abb. 18).

Es kann folglich geschlossen werden, dass das SplitUB-System *in trans* in Hefe einen zu hohen Anteil nicht auszuschließender Interferenzen aufweist, die den Nachweis einer möglichen Interaktion zwischen den Domänen von NtCDPK2 verhindern. Daher wurde das zwar ebenfalls heterologe, jedoch der *in vivo*-Situation von *N. tabacum* sehr viel näher verwandte Expressions-System *N. benthamiana* gewählt.

3.2.2 SplitUB *in planta, in trans*

Über die transiente Expression mittels *Agrobacterium tumefaciens* konnten in dieser Arbeit die Konstrukte des SplitUB-Systems aus Hefe auch in Pflanze eingebracht werden. Hierbei wurden *in trans*-Interaktionen von Kinase- bzw. Calmodulin-ähnlicher Domäne mit nativem J oder Jmut untersucht. Da im homologen System *N. tabacum* nur ein niedriges Expressions-Niveau zu erreichen ist und der Silencing-Inhibitor p19 die Expressions-Rate nicht steigern kann (Voinnet *et al.*, 2003), wurde in dieser Arbeit auf das heterologe System *N. benthamiana* zurückgegriffen. Dennoch hätte sich die Verwendung von *N. tabacum* als vorteilhaft erweisen können, da in diesem System ein Stress-Stimulus zu einer fast vollständigen Änderung in der elektrophoretischen Mobilität (Shift) von NtCDPK2 führt, was auf eine signifikante Konformations-Änderung schließen lässt (Romeis *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2001). Hingegen kann in *N. benthamiana* kein derart vollständiger Shift erzeugt werden, so dass nur rund 20% der Moleküle in der aktivierten Form vorliegen (Romeis *et al.*, 2001).

Das in dieser Arbeit entwickelte Reporter-Konstrukt bestehend aus NtCDPK2(J), dem C-Terminus von Ubiquitin und dem Grün-fluoreszierenden Protein (J-Cub-R-lacI'-HA-GFP) wurde nach transienter Expression bereits ohne Nub-Konstrukt zu 63% gespalten (s. Abb. 23). Die Spaltungs-Effizienz konnte hierbei durch Koexpression mit Nub-VK nicht signifikant gesteigert werden. Folglich ist analog den bereits beschriebenen Ergebnissen aus dem Hefe-System eine Interaktion zwischen VK und J auch in diesem Fall nicht eindeutig nachweisbar. Ein Erklärungsansatz kann auch hier in der möglichen Interferenz von Pflanzen-intrinsischen Calmodulinen oder Calmodulin-ähnlichen Proteinen liegen. Hierbei ist eine direkte Bindung von J an eine CDPK aus *N. benthamiana* (NbCDPK2) denkbar, da diese eine 95%ige Homologie zu NtCDPK2 aufweist. Das Expressionsniveau von NbCDPK2 sollte jedoch erheblich niedriger als das der transienten Konstrukte sein, so dass diese Interferenz zu vernachlässigen wäre.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Nub-VK konnte eine gesteigerte Spaltungseffizienz des Reporter-Konstrukts von 74% bei Koexpression von Nub-CLD erhalten werden (s. Abb. 23). Die somit nachgewiesene Interaktion zwischen J und CLD bestätigt sowohl das theoretische Modell, in dem diese Domänen in der aktiven Form der CDPK interagieren, als auch die *in vitro*-Daten anderer CDPKs. Hierbei interagierten die Domänen VKJ bzw. J mit der CLD bzw. Calmodulin (Huang *et al.*, 1996; Vitart *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion zwischen J und dem Gerste-Calmodulin HvCaM3 in Hefe sollte in zukünftigen Experimenten *in planta* bestätigt werden.

3.3 Konformationen von NtCDPK2, Interaktionen *in cis*

3.3.1 SplitUB in Hefe, *in cis*

Zur Untersuchung der Gesamt-Konformation und intra-molekularer Interaktionen von NtCDPK2 wurde zunächst das etablierte *in cis*-SplitUB-System aus Hefe verwendet. Das zu untersuchende Protein wurde hierbei zwischen ein N-terminales Nub und ein C-terminales Cub fusioniert. Als Reporter diente das Protein Dihydrofolat-Reduktase mit einem HA-Epitoptag (Dha).

Die bereits publizierten Spaltungsraten für die Kontrollproteine Guk1p, Fpr1p und Fpr1pMC konnten bestätigt werden (s. Abb. 24; Raquet *et al.*, 2001). Eine Fusion von NtCDPK2 zwischen Nub und Cub führte zu einer ca. 32%igen Abspaltung des Reporters (s. Abb. 24). Eine intermolekulare Interaktion zweier Fusionsproteine *in trans* ist jedoch nicht auszuschließen. Zur näheren Analyse könnten in diesem Fall zwei Vektoren dienen, in denen einerseits Nub-NtCDPK2 und andererseits NtCDPK2-Cub-Dha exprimiert werden. Da jedoch *in planta*-Versuche zeigten, dass eine *in trans*-Auto-Phosphorylierung von NtCDPK2 *in vivo* nicht stattfindet (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht), ist eine *in cis*-Interaktion von Nub und Cub im SplitUB-Konstrukt mit NtCDPK2 wahrscheinlicher.

Im Vorfeld war nicht zu beurteilen, ob die in J eingeführten Mutationen einen verringerten oder vergrößerten Abstand der beiden Enden der CDPK zufolge haben. Die Mutationen bedingten eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Spaltungsrate von 22% (s. Abb. 24). Dies weist auf eine veränderte Konformation der mutierten CDPK hin. Damit gelang es in dieser Arbeit erstmals experimentell *in vivo* zu beweisen, dass die zentrale Rolle von J hinsichtlich eines Einflusses auf die Kinase-Funktion auch essentiell für die Gesamt-Konformation von CDPKs ist.

Des Weiteren konnte der Einfluss der Calcium-Bindung auf die Konformation von NtCDPK2 in Hefe nachgewiesen werden. Hierbei führte eine Steigerung der Calcium-Konzentration im Medium zu einer Annäherung von N- und C-Terminus des Proteins (s. Abb. 26). Allerdings

ist auch bekannt, dass die Anwesenheit von Ca^{2+} den proteolytischen Abbau von CDPKs erleichtert (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht), weswegen die Bande des Gesamt-Konstrukts schwächer sein könnte und somit die Spaltungs-Rate zu hoch erscheint.

Darüber hinaus war ein Unterschied in der Spaltungs-Effizienz in Abhängigkeit von den in J eingeführten Mutationen auch bei den SplitUB-Konstrukten mit verkürzten NtCDPK2-Versionen (VKJ und VKJmut) erkennbar. Die Differenz zwischen VKJ (47%) und VKJmut (29%) war zudem deutlich größer als bei der vollständigen CDPK (vgl. Abb. 24 und 25). Da die Mutationen in J in dem Gesamt-Konstrukt relativ zentral, in VKJ jedoch am C-Terminus des zu untersuchenden Proteins liegen, beeinflussen diese somit die Interaktion von Nub und Cub stärker. Darüber hinaus bedingt die geringere Größe des Proteins in den verkürzten Versionen ein wahrscheinlicheres Zusammentreffen der Ubiquitin-Hälften. Aus diesem Grund lässt sich auch die erhöhte Spaltungs-Effizienz bei den VKJ-Varianten (47% bzw. 29%) im Vergleich zu den entsprechenden Gesamt-CDPK-Formen (32% bzw. 22%) erklären.

3.3.2 SplitUB *in planta*, *in cis*

Das SplitUB-System konnte auch *in cis* erstmals im transienten Expressionssystem in *N. benthamiana* angewandt werden. Versuche mit den bereits in Hefe verwendeten Kontrollproteinen Guk1p und Fpr1p wiesen einen klaren Unterschied in den Spaltungs-Raten der beiden Konstrukte auf. Bei Guk1p zeigte sich mit 78% eine wesentlich höhere Spaltungs-Effizienz als bei Fpr1p mit 56% (s. Abb. 27). Hingegen konnte der im Hefe-System erhaltene, geringe Unterschied zwischen Fpr1p (27%) und Fpr1pMC (41%) nicht gleichermaßen deutlich *in planta* nachgestellt werden. Die Spaltungs-Raten des Reporters in den Konstrukten mit Fpr1p und Fpr1pMC zeigten keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 27). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Konformationen der Proteine in Hefe sich im heterologen Pflanzen-System wahrscheinlich nicht vollständig nachbilden lassen. Somit sind Unterschiede in Hefe-Proteinen mit dem SplitUB-System *in planta* nur bedingt nachweisbar.

Bei Bestimmung der Konformation von NtCDPK2 zeigten sich beim Wildtyp und der in J mutierten Variante mit 62% bzw. 63% nahezu identische Spaltungs-Effizienzen. Ein Unterschied konnte jedoch durch die Einführung der Myristoylierungs-Sequenz (nachfolgend *) am N-Terminus des Nub erhalten werden. So zeigte das Konstrukt *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha ca. 55% Abspaltung des Dha, hingegen bei mutiertem J nur annähernd 43% (s. Abb. 28). Die Ergebnisse aus dem Hefe-System sind somit auch *in planta* reproduzierbar, wobei jedoch der korrekten Lokalisierung der CDPK bei der Konformations-Analyse in *N. benthamiana* offenbar eine hohe Bedeutung zukommt.

Darüber hinaus ist die Differenz der in Hefe exprimierten Fpr1p-Varianten mit 14% deutlich größer als im heterologen System in *N. benthamiana* (1-4%). Im reziproken Vergleich ist ebenso der Unterschied in der Spaltungs-Rate zwischen wt- und Jmut-NtCDPK2-

Fusionsproteinen in Pflanze je nach Experiment mit 13-34% wesentlich größer als in Hefe (10%). Dies zeigt, dass Konformations-Analysen im jeweils homologen System eindeutiger Aussagen liefern als bei heterologer Expression.

Um den Anteil der bereits im Pflanzen - *in trans* - System beobachteten Hintergrund-Spaltung des Reporters ohne Anwesenheit eines Nub-Konstrukts (s. Abb. 23) auch *in cis* beurteilen zu können, wurde *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha mit NtCDPK2-Cub-Dha verglichen. Dabei zeigte sich eine 30-40%ige Abspaltung des Reporters im Konstrukt ohne *Nub, wohingegen mit *Nub eine Spaltungs-Rate von 55% erhalten wurde (s. Abb. 29). Folglich ist bei nachfolgenden Experimenten eine Hintergrund-Spaltung von ungefähr 40% zu berücksichtigen. Dieser hohe Werte konnte von Raquet *et al.* in Hefe nicht beobachtet werden (Raquet *et al.*, 2001). Ein Hauptunterschied der Systeme besteht darin, dass die SplitUB-Konstrukte in Hefe erst nach Induktion durch CuSO₄ innerhalb einer Stunde exprimiert werden und Dha in geringerer Menge akkumuliert. Beim Pflanzen-System hingegen ist die Expression unter der Kontrolle des 35S-Promotors dauerhaft hoch, so dass Unterschiede in der Spaltungs-Effizienz des Reporters durch dessen Akkumulation mit der Zeit verloren gehen können. Somit ist bei Probennahme einige Tage nach Infiltration der Agrobakterien eine mögliche Abweichung nur schwer oder nicht mehr detektierbar.

Um dem System in Hefe ähnlicher zu werden, wurden die ORFs unter Kontrolle des Alkohol-induzierbaren Promotors pAlcA exprimiert. Diese Studien zeigten jedoch keinen klaren Unterschied im Vergleich zur Verwendung des konstitutiven 35S-Promotors. Auch Differenzen in den absoluten Banden-Intensitäten der Western-Blots waren offensichtlich zu vernachlässigen, da der detektierbare Unterschied in der Spaltungs-Rate ein und derselben Probe zwischen 5 µl und 15 µl Probenauftrag lediglich 2% betrug.

In den Experimenten konnten Gesamtspaltungs-Effizienzen für *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha zwischen 49% und 87% (vgl. Abb. 34, Abb. 35), für die in J mutierte Version zwischen 22% und 42% (vgl. Abb. 28, Abb. 31) beobachtet werden. Gründe für diese Streuung der Werte liegen offensichtlich sowohl in Unterschieden der Expressionsraten zwischen einzelnen Blättern von *N. benthamiana* als auch der Dauer der elektrophoretischen Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Membran. Innerhalb eines weiteren Experiments mit gleichartiger Behandlung der Pflanzen und Protein-Proben waren Blatt-spezifische Unterschiede in den Spaltungs-Raten von bis zu 17% erkennbar. Wie in Abbildung 35 dargestellt zeigten sich zum Zeitpunkt 0 des später EGTA-infiltrierten Blatts 87% Spaltung, hingegen im später Cantharidin-infiltrierten Blatt nur 70%. Daher waren in Folge-Experimenten die relativen Spaltungs-Effizienzen von Proben desselben Blattes zu bewerten, nicht die absoluten Effizienzen. Daher wurden direkte Vergleiche von Konstrukten nur bei gleichzeitiger Expression auf zwei Hälften desselben Blattes durchgeführt.

In einem weiteren Experiment wurde die Abhängigkeit der Konformations-Änderung zwischen NtCDPK2 und NtCDPK2mut von der Kinase-Aktivität untersucht. Dazu wurde eine Mutation im Aktiven Zentrum der Kinase eingeführt (D241A), die zur Inaktivierung des

Enzyms führt (Ludwig *et al.*, 2005). Schon phänotypisch zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Kinase-inaktiver Form. Die in J mutierte, Kinase-inaktive Form *Nub-NtCDPK2mut(D241A)-Cub-Dha ließ nach Trypanblau-Färbung im Vergleich zur Kinase-aktiven Form keinen Zelltod erkennen (s. Abb. 30, A). Durch die Rechner-gestützte, graphische Auswertung der Proben-Luminanz wurde dieser Unterschied eindeutig quantifizierbar. Auch der visuell kaum erkennbare Unterschied zwischen den Formen mit Wildtyp-Junction-Domänen konnte hierbei herausgearbeitet werden (s. Abb. 30, B).

Im Western-Blot konnte keine Veränderung zwischen den J-Wildtyp-Formen mit aktiver oder inaktiver Kinase-Domäne gefunden werden. Die Konstrukte zeigten mit 56% bzw. 55% keine deutlich voneinander abweichenden Spaltungs-Effizienzen (s. Abb. 31, B). Die identische Rate wurde auch beim NtCDPK2mut(D241A)-Konstrukt (56%) erreicht, wohingegen es bei der Kinase-aktiven CDPK lediglich zu einer 22%igen Spaltung kam (s. Abb. 31, B). Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die aktivere Form NtCDPK2mut nur dann eine Konformationsänderung gegenüber dem Wildtyp aufweist, wenn die Kinase aktiv bzw. aktivierbar ist.

Grundlage für einen weiteren Ansatzpunkt der NtCDPK2-Analyse besteht darin, dass wie bereits durch Witte *et al.* nachgewiesen, Mutationen der für den elektrophoretischen Shift verantwortlichen Phosphorylierungs-Stellen in NtCDPK2(VK) die Konformation des Enzyms verändern (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). So führte eine Alanin-Mutation beider Positionen (AA) zu einer elektrophoretischen Mobilität, wie sie die inaktive Form von NtCDPK2 aufweist. Im Gegensatz dazu zeigte eine jeweils zu Aspartat mutierte Version (DD) einen vollständigen Shift. Bei Einführung dieser Mutationen in das SplitUB-Konstrukt von NtCDPK2 konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Spaltungs-Effizienz aufgezeigt werden. Sowohl die jeweilige Mutation zu Alanin als auch zu Aspartat zeigte eine Spaltungsrate des Reporters zwischen 40% und 50% (s. Abb. 32). Einen möglichen Erklärungs-Ansatz lieferten phänotypische Beobachtungen in bereits zuvor durchgeführten Studien (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht). Hierbei führte die Mutation der Phosphorylierungs-Stellen in NtCDPK2(VK) bei Vergleich mit dem Wildtyp zu einem sehr geringen Aktivitäts-Unterschied, der sich ausschließlich nach Rechner-gestützter, graphischer Auswertung des Zelltod-Phänotyps erfassen ließ. Da hier zwischen DD-Version und Wildtyp die größte Differenz im Zelltod erkennbar war, sollte in zukünftigen Experimenten diese Kombination im SplitUB-System im direkten Vergleich untersucht werden.

Weiterhin ist auffällig, dass sowohl die Mutationen nach Alanin als auch nach Aspartat im NtCDPK2mut-Konstrukt die Spaltungs-Effizienz auf das Wildtyp-Niveau zurücksetzen (vgl. Abb. 31, 32). Offensichtlich resultiert aus diesen Mutationen eine Konformations-Änderung der CDPK, die von Jmut unabhängig zu sein scheint. Hierbei steht jedoch wiederum der direkte Vergleich der entsprechenden Konstrukte aus.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Calcium-Bindung auf die Konformation von NtCDPK2 analysiert. Hierzu wurde die CLD mit der Konsensus-Sequenz

für EF-Hände verglichen, um die für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlichen Aminosäuren zu lokalisieren (s. Abb. 33). Durch Mutationen der z-Stellen von Glutamat nach Glutamin, die vermutlich die Struktur einer einzelnen EF-Hand nicht ungewöhnlich stark modifizieren, kann demzufolge kein Calcium mehr komplexiert werden. Somit sollte eine veränderte Gesamtkonformation der CDPK lediglich durch die fehlende Ca^{2+} -Bindung zustande kommen.

Die Einführung dieser Mutationen in die EF-Hände #3 und #4 im SplitUB-Konstrukt von NtCDPK2 führte zu einer signifikant gesteigerten Spaltungs-Rate des Dha-Reporters (s. Abb. 34) und lässt auf eine deutliche Konformations-Änderung des Proteins schließen.

Diese Beobachtung kann bei Vergleich mit einem Aktivierungs-Modell für CDPKs nach Christodoulou *et al.* erklärt werden (Christodoulou *et al.*, 2004). Dieses postuliert nach Untersuchungen an AtCPK1 einerseits eine ständige Komplexierung von Calcium an die EF-Hände #3 und #4 aufgrund einer höheren Ca^{2+} -Affinität und andererseits eine Konzentrations-abhängige Bindung an die N-terminalen EF-Hände. Nur durch letztere wird daher eine Struktur-Änderung bei der Aktivierung des Enzyms hervorgerufen. Die in dieser Arbeit unterbundene Komplexierung von Calcium an die C-terminalen EF-Hände bestätigt somit *in vivo* die Bedeutung dieser EF-Hände für die Gesamtkonformation einer CDPK.

In zukünftige Analysen sollten weitere Kombinationen von Mutationen überprüft werden. So sollte nach oben genanntem Modell z.B. für eine in den beiden N-terminalen EF- Händen mutierte Version eine nur geringe Konformations-Änderung zu finden sein.

Ein Ansatzpunkt für die Untersuchung von Struktur-Änderungen von NtCDPK2 war der im Western-Blot beobachtete Shift nach Stress-Stimulus. Um eine NtCDPK2-Aktivierung im SplitUB-System zu untersuchen, wurden unterschiedliche Stress-Arten in *N. benthamiana* angewandt. Nachdem erste Versuche mit einer Infiltration von Wasser oder einer Gen-für-Gen-Interaktion (Cf-9/Avr9) in *N. benthamiana* keine veränderten Abspaltungs-Raten des Dha aufwiesen, wurde das SplitUB-System in *N. tabacum* angewandt. Da hier jedoch die Expressionsrate sehr viel geringer war (Daten nicht gezeigt), konnten keine definitiven Aussagen über die Spaltungs-Effizienz getroffen werden.

Folgende Untersuchungen beschränkten sich daher auf *N. benthamiana* mit weiteren Stress-Stimuli. Eine Infiltration von EGTA zeigte keinen Unterschied in der Konformation (s. Abb. 35), während nach Infiltration des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin eine leichte, Stimulus-abhängige Konformations-Änderung zu detektieren war. Hierbei konnte nach zwei Stunden ein Anstieg der Spaltungs-Effizienz des Reporter von 70% auf 75% detektiert werden (s. Abb. 35). Dies könnte als Indiz für eine Stimulus-abhängige Konformations-Änderung einer CDPK *in vivo* gewertet werden.

Da bislang nicht nachgewiesen ist, dass eine Infiltration von Calcium oder EGTA in den Interzellular-Raum auch zu einer veränderten Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Zellen führt, müssten andere Mechanismen zum Einsatz kommen, die nachweislich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen.

Zudem kann nicht eindeutig beurteilt werden, ob gesteigerte Spaltungs-Raten durch eine geringfügige Konformations-Änderung des betrachteten, gesamten NtCDPK2-Pools verursacht werden oder eine erhebliche Änderung in wenigen, aber dafür vollständig aktivierten Molekülen zustande kommt. Eine ähnliche Problematik trat schon für die transiente Expression von NtCDPK2 in *N. benthamiana* im Gegensatz zum homologen System *N. tabacum* auf, da in letzterem ein nahezu 100%iger Shift nach adäquatem Stimulus erreicht werden kann, in *N. benthamiana* jedoch lediglich ca. 20% in der aktivierten Form vorliegen (Romeis *et al.*, 2001). Zudem führt erfahrungsgemäß schon eine leichte Berührung der exprimierenden Blätter zu einer teilweisen Aktivierung von NtCDPK2 (Daten nicht gezeigt).

Um die nur teilweise Aktivierung des untersuchten Proteins zu umgehen, sollte im Folgenden das SplitUB-System bei anderen Proteinen angewandt werden, für die bereits eine deutliche Struktur-Änderung beschrieben ist.

3.4 Konformationen von Cryptochrom *in planta*

Das neu etablierte SplitUB-System in Pflanzen wurde weiterhin auch für *in vivo*-Untersuchungen anderer Proteine angewandt. CDPKs weisen viele Übereinstimmungen mit spezifischen Blaulichtrezeptoren (sog. Cryptochromen) in ihrer durch Phosphorylierungen verursachten Mobilitäts-Änderung oder der Stimulus-abhängigen Aktivierung auf.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Batschauer (Philipps-Universität Marburg) wurde das Cryptochrom AtCRY2 aus *A. thaliana* im SplitUB-System untersucht. Für das AtCRY2-Protein konnte bereits ein mit NtCDPK2 vergleichbarer, Phosphorylierungs-abhängiger Shift beobachtet werden (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2003). Es wurden zwei Versionen dieses Cryptochroms verwendet, die sich lediglich in ihrer C-terminalen Aminosäure unterscheiden. Nach transienter Expression in *N. benthamiana* zeigten diese eine Spaltungs-Effizienz des Dha-Reporters von 55% beim Wildtyp und signifikant abweichenden 52% bei der Q612K-Mutante (s. Abb. 36). Dies bestätigte die Theorie, dass bereits geringfügige Modifikationen der Aminosäuresequenz vorrangig an den Enden des untersuchten Proteins die Orientierung der fusionierten Ubiquitin-Hälften zueinander verändern können. Ähnliches ist sowohl von Raquet *et al.* als auch in dieser Arbeit für das Protein Fpr1p in Hefe gezeigt worden (s. Abb. 24; Raquet *et al.*, 2001).

In einem ersten Experiment zur Stimulus-Abhängigkeit des Cryptochroms wurden die Pflanzen in eine Dunkelkammer gestellt, wobei sich keine detektierbare Konformations-Änderung in beiden Versionen von AtCRY2 nachweisen ließ (s. Abb. 36). Jedoch konnte durch die Belichtung von länger abgedunkelten Pflanzen eine signifikante Zunahme der Spaltungs-Effizienzen beobachtet werden, womit eine deutliche Änderung in der Gesamt-

Struktur des Blaulicht-Rezeptors nachgewiesen ist (s. Abb. 37). Dieses Ergebnis bestätigt daher *in vivo* das Aktivierungs-Modell für Cryptochrome, welches eine Konformations-Änderung nach Licht-Stimulus postuliert (s. Abb. 8; Yang *et al.*, 2000).

Einschränkend ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine Belichtung von AtCRY2 auch zu einem gesteigerten Abbau des Proteins führt und so eine allgemeine Verringerung der Konzentration des vollständigen SplitUB-Konstrukts nach sich ziehen könnte. Gegen diese These spricht allerdings, dass die Intensität der Gesamtkonstrukt-Banden von im Licht gezogenen Pflanzen keine signifikante Reduktion gegenüber Proben zeigt, die von in Dunkelheit kultivierten Pflanzen stammten (vgl. Abb. 36, Abb. 37). Weitere Versuche zur Bestätigung dieser ersten Ergebnisse stehen noch aus.

3.5 Mögliche Optimierungen des SplitUB-Systems *in planta*

Für vertiefende Untersuchungen mit dem SplitUB-System in Pflanze sind verschiedene Optimierungen denkbar, die die Hintergrundspaltung des Reporters weiter verringern. So könnte das in diesem System verwendete Hefe-Ubiquitin durch ein Pflanzen-Ubiquitin substituiert werden, wobei letzteres allerdings nur Aminosäuresequenz-Abweichungen im einstelligen Prozentbereich aufweist. Signifikante Unterschiede beider Varianten sind daher nicht zu erwarten.

Ein sinnvollerer Ansatzpunkt liegt hier in der gezielten Mutation von Nub und Cub, welche die Affinität der beiden Fragmente zueinander verstärkt und zu einer deutlicheren Differenzierung zwischen einer Spaltung nach Interaktion und dem Hintergrund führt. Zudem müsste durch eine andersartige Teilung des Ubiquitins ein Zustand herbeigeführt werden, in dem der C-Terminus für die Pflanze nicht mehr als Ubiquitin zu erkennen ist. Ähnliche, jedoch für die direkte Anwendung *in planta* nicht nutzbare Versuche wurden für die Entwicklung eines neuartigen „*split protein*“-Sensors für Hefe aus der N-(5'-phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase Trp1p bereits erfolgreich durchgeführt (Tafelmeyer *et al.*, 2004). Hierbei wurden mehrere Varianten eines Split-Trp1p durch zufällige Teilung des TRP1-Gens und ein anschließendes Selektions-Verfahren generiert. Eine vergleichbare Technik wäre *in planta* jedoch aufwendig und müsste darüber hinaus für Untersuchungen *in cis* entwickelt werden.

Vertiefende Untersuchungen mit dem derzeitigen SplitUB-System in Pflanze sind zukünftig in Form eines „*pulse-chase*“-Experiments durchzuführen, das bereits für Hefe etabliert wurde (Raquet *et al.*, 2001). Hierbei wird den Hefen [³⁵S]-markiertes Methionin zugeführt, anschließend werden die nach einer definierten Zeit produzierten Proteine über das Epitoptag am Dha-Reporter immun-präzipitiert, und nach einer SDS-PAGE die markierten Proteine

autoradiographisch detektiert. Dabei kann unter Umständen eine genauere Aufschlüsselung der Anteile von Gesamt-Konstrukt und abgespaltenem Reporter erfolgen.

Erste Untersuchungen mit dieser Methode in Hefe zeigten jedoch keine grundlegend neuen und von den im Western-Blot generierten Daten abweichenden Ergebnisse (Raquet *et al.*, 2001). Außerdem wird sich in dieser Form das „*pulse-chase*“-Experiment in Pflanze äußerst schwierig gestalten lassen, da bereits die Infiltration der radioaktiven Methionin-Lösung zu einer Aktivierung von NtCDPK2 führt und zusätzlich im anschließenden „*chase*“ die im Interzellular-Raum befindliche Radioaktivität komplett verdrängt werden muss. Ohne eine vollständige Verdrängung werden radioaktiv markierte Proteine, wie in der bisherigen Methode mit Western-Blot, auch in dieser Analyse bis zum „*steady-state level*“ akkumulieren.

3.6 „*Bimolecular Fluorescence Complementation*“ (BiFC)

Das „*Bimolecular Fluorescence Complementation*“ (BiFC) - System konnte in dieser Arbeit erstmals für die transiente Expression in *N. benthamiana* angewandt werden. Als Kontrolle wurde zunächst die Interaktion anhand des bZIP-Transkriptionsfaktors AtCPRF2 untersucht. Aus anderen BiFC-Expressions-Systemen wie Zwiebelschuppen-Epidermiszellen und Arabidopsis-Protoplasten war bereits bekannt, dass AtCPRF2 Homo-Dimere im Zellkern ausbildet und somit die YFP-Fluoreszenz rekonstituiert (Walter *et al.*, 2004). Auch in *N. benthamiana*-Pflanzen war die Fluoreszenz eindeutig und ausschließlich im Zellkern aufzufinden (s. Abb. 38). Hierbei zeigten sich Nukleus-interne Aggregate und eine starke Fluoreszenz nach längerer Expressionszeit, wohingegen die Negativ-Kontrolle mit freiem N-Terminus von YFP (NYFP) eine schwächere Fluoreszenz im Kern erkennen ließ (s. Abb. 38). Jene in dieser Arbeit generierten Daten wurden auch bereits in einer Publikation durch Walter *et al.* verwendet (Walter *et al.*, 2004).

Die anschließende Untersuchung der Domänen-Interaktionen von NtCDPK2 mittels BiFC zeigte wie für AtCPRF2 eine Fluoreszenz bereits bei Koexpression der an CYFP fusionierten Domäne mit freiem NYFP (s. Abb. 39, A; Tab. 1). Die dabei beobachtete Fluoreszenz von beweglichen Vesikeln bei Konstrukten, welche die Variable Domäne (V) von NtCDPK2 enthielten, lässt auf eine korrekte Lokalisierung der Proteine im BiFC-System schließen (s. Abb. 39 A, Tab. 1). Ähnliche Vesikel wurden auch bei Fusionskonstrukten der kompletten NtCDPK2 mit C-terminalem GFP nach Expression in *N. benthamiana* gefunden (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht), könnten allerdings Überexpressions- oder Stress-Artefakte darstellen. Lu *et al.* deuteten vergleichbare Vesikel der an GFP fusionierten AtCPK2 aus *A. thaliana* als „*ER-bodies*“, d.h. aus dem Endoplasmatischen Retikulum abgeschnürte Kompartimente (Lu und Hrabak, 2002). Analoge Beobachtungen konnten bei *A. thaliana* in

Epidermis-Zellen und nach Stress-Induktion gemacht werden (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura und Matsushima, 2003).

Vermutlich in Abhängigkeit der Expressions-Stärke schwankten Stärke und Lokalisierung der Fluoreszenz und waren zunächst nur schwer interpretierbar. Bei der Optimierung des Systems zeigte sich, dass die aussagekräftigsten Ergebnisse in einem Zeitraum zwischen dem fünften und siebten Tag nach Infiltration der Agrobakterien erhalten werden konnten. Die Interaktion zwischen den Konstrukten VKJ-NYFP und CLD-CYFP konnte eindeutig durch die Fluoreszenz bei Koexpression im BiFC-System nachgewiesen werden. Als Negativ-Kontrolle dient die Kombination CLD-NYFP mit CLD-CYFP, die zu keiner YFP-Fluoreszenz führte (s. Tab. 1). Auch in einem Experiment mit den reziproken Konstrukten wurde eine Interaktion erhalten, wobei ein gesicherter Nachweis aufgrund der nicht möglichen Negativ-Kontrolle ausbleibt, da VKJ-CYFP eine vom koexprimierten Fusionsprotein unabhängige Fluoreszenz aufweist (s. Tab. 1).

Aufgrund der starken Fluoreszenz der Kontroll-Kombination des Fusions-Proteins NtCDPK2-CYFP und NYFP sowie keiner offensichtlichen Veränderung bei Koexpression mit anderen an NYFP fusionierten CDPK-Domänen konnten keine verlässlichen Erkenntnisse für die weiteren, untersuchten Domänen-Interaktionen erhalten werden (s. Tab. 2).

Die daraufhin näher analysierte Interaktion von VKJ und CLD zeigte jedoch weder nach Infiltration von Wasser noch von CaCl_2 eindeutige Veränderungen. Lediglich geringfügige Unterschiede nach Cantharidin-Stimulus waren bei der Koexpression von VKJ-CYFP und CLD-NYFP nachweisbar. Die Beurteilung dieser Ergebnisse ist hierbei ambivalent, da der Phosphatase-Inhibitor Cantharidin mit hoher Wahrscheinlichkeit auch andere zelluläre Prozesse beeinflusst. Auch die allgemeine Abnahme der Fluoreszenz bei den meisten anderen nach Cantharidin-Infiltration untersuchten Kombinationen zeigt, dass das BiFC-System in diesem Zusammenhang nur erste Hinweise auf den molekularen Mechanismus der Aktivierung geben kann. BiFC erwies sich daher für die Zielsetzung der Untersuchung von Stimulus-abhängigen Änderungen von NtCDPK2-Domänen-Interaktionen in dem Pflanzen-System *N. benthamiana* als wenig geeignet, wohingegen es für den bloßen Nachweis von Interaktionen für andere Proteine vermehrt erfolgreich angewandt werden konnte (persönliche Auskunft Dr. A. Schnittger, MPIZ, Köln; Walter *et al.*, 2004)

3.7 Intramolekularer „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET)

Eine alternative Methode zur Analyse von Konformations-Änderungen besteht im intramolekularen „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET). Dieses *in trans* etablierte System konnte bereits in den unterschiedlichsten Organismen Interaktionen zwischen Proteinen aufzeigen, wie z.B. auch in menschlichen Krebszellen (Damjanovich *et al.*, 1995; Gadella und Jovin, 1995).

Der in dieser Arbeit angewandte, intramolekulare FRET *in cis* konnte bereits am Beispiel des „Chamäleon“-Proteins Konformations-Änderungen darstellen (Miyawaki *et al.*, 1997). Durch die N-terminale Fusion eines YFP an das zu untersuchende Protein sowie die C-terminale Fusion eines CFP sollte eine Annäherung von N- und C-Terminus nachweisbar werden.

Um zunächst die Funktionalität der NtCDPK2-FRET-Konstrukte zu bestätigen, wurden diese transient in *N. benthamiana* exprimiert. Hierbei konnte kein deutlicher Zelltod für die NtCDPK2mut-Variante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Hingegen führte die Expression des VKJmut-Fusionsproteins zu einer HR-ähnlichen Reaktion, die sich zudem signifikant vom Phänotyp des VKJ-Konstrukts unterschied (s. Abb. 40, B). Außerdem zeigte VKJmut einen vergleichbaren Zelltod wie die deregulierten Versionen NtCDPK2(VK) (Ludwig *et al.*, 2005) und HvCDPK4(VK) (Freymark *et al.*, in Vorbereitung). Auf der anderen Seite bestätigt die *in vivo*-Inhibierung der Kinase durch die Junction-Domäne in dem VKJ-Konstrukt auch *in vitro*-Daten (Harper *et al.*, 1994). Diese konnten für die VKJ-Variante von AtCPK1 aus *A. thaliana* eine basale Aktivität in Höhe der des Gesamt-Proteins nachweisen, welche durch Bindung des J-Autoinhibitors an einen Antikörper sehr deutlich gesteigert wurde. Hingegen war diese Auto-Inhibition durch Einführung von Mutationen in J nicht mehr möglich und führte daher zu einer deregulierten Kinase.

Die Untersuchung von YFP-NtCDPK2-CFP mittels Akzeptor-„*Photobleaching*“ ließ eine relativ hohe FRET-Effizienz erkennen. Mit durchschnittlich 30% für den Wildtyp (s. Abb. 42) lag diese deutlich höher als publizierte Werte von maximal 25% (Bhat *et al.*, 2005). Hingegen zeigte das NtCDPK2(mut)-Fusionsprotein mit ca. 16% eine nahezu halbierte FRET-Effizienz (s. Abb. 42). Dies deutet darauf hin, dass die Distanz zwischen N- und C-Terminus der in J mutierten CDPK sehr viel größer als beim Wildtyp ist.

Die zudem beobachtete schnelle Wiederherstellung der YFP-Fluoreszenz nach dem Bleichen weist auf eine hohe Mobilität und folglich auf eine Lokalisierung der Konstrukte im Cytoplasma hin. Die Steigerung der FRET-Effizienzen innerhalb der Messreihe (s. Anhang, Tab. 9) wird durch die zum Auffinden weiterer fluoreszierender Epidermis-Zellen nötige zwischenzeitliche Bestrahlung der gesamten Probe mit UV-Licht verursacht. Dieses führt erfahrungsgemäß schnell zum allgemeinen Bleichen des YFP (persönliche Auskunft Dr. R. A. Bhat, MPIZ, Köln). Daher konnte der zurückbleibende Anteil des YFP in Folgeexperimenten schneller gebleicht werden und somit zu einer stärkeren FRET-Effizienz führen.

Die vorliegenden Ergebnisse beweisen erstmalig die räumliche Annäherung von N- und C-Terminus einer CDPK *in vivo* mit intramolekularem FRET. Effizienzen von ungefähr -6% im ungebleichten Kontrollbereich lagen ebenso wie die starke Streuung der Messwerte im Rahmen publizierter Ergebnisse (Bhat *et al.*, 2005). Eine Interaktion zweier FRET-Fusionsproteine *in trans* bleibt ebenso wie im beschriebenen SplitUB-System *in cis* nicht völlig auszuschließen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine intramolekulare Wechselwirkung im FRET-System wesentlich wahrscheinlicher als eine intermolekulare Interaktion ist (persönliche Auskunft Dr. M. Hink, Wageningen, Niederlande).

3.8 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des SplitUB-Systems lassen einen grundlegenden Zusammenhang zwischen Konformation und biologischer Aktivität von NtCDPK2 erkennen. So führte die Mutation von J einerseits zu einem HR-ähnlichen Zelltod (s. Abb. 20), andererseits zu einer niedrigeren Spaltungs-Rate (s. Abb. 24 in Hefe; Abb. 28, Abb. 31 *in planta*), d.h. einer „offeneren“ Konformation des Gesamtproteins. Auch der Phänotyp der FRET-Konstrukte (s. Abb. 40) und die gemessenen FRET-Effizienzen (s. Abb. 42) deuten auf diesen Zusammenhang hin. Ebenso folgte aus einer Inaktivierung der Kinase durch Mutation des Aktiven Zentrums (D241A) eine gesteigerte Spaltungs-Effizienz bei NtCDPK2mut (s. Abb. 31), wodurch von einer geschlosseneren Struktur ausgegangen werden kann.

Zudem liefern die Daten der VKJ-Konstrukte im SplitUB-System in Hefe (s. Abb. 25) den Hinweis, dass ein Großteil der durch die Mutationen in J verursachten Konformations-Änderung durch Unterschiede in der Bindung zwischen J und der Kinase-Domäne zustande kommt.

Weiterhin scheint die korrekte Lokalisierung der CDPK in einem Membran-Kompartiment von grundlegender Bedeutung zu sein. So wurde in dieser Arbeit ein eindeutiger Konformations-Unterschied zwischen NtCDPK2 und der in J mutierten Variante erst nach Einführung der N-terminalen Myristoylierungs-Sequenz beobachtet (s. Abb. 28). Der Zusammenhang zwischen Lokalisierung und biologischer Aktivität war auch in einem Experiment von Witte *et al.* beobachtet worden, bei dem eine Expression der deregulierten VK-Variante zum Zelltod führte. Hingegen war für eine Mutante, bei der die zweite Aminosäure durch ein Alanin ersetzt wurde und die somit nicht mehr myristoyliert werden konnte (G2A), kein Zelltod zu detektieren (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht).

Bei Vergleich dieser Ergebnisse mit denen im SplitUB-System können wiederum Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Aktivität und Konformation gefunden werden, wobei die Lokalisierung eine entscheidende Rolle spielt. Hierbei ist zu vermuten, dass die vollständige Aktivierung von NtCDPK2 nur an der Membran zustande kommt, da hier eine oder

verschiedene andere Kinasen die Stimulus-abhängige Phosphorylierung der CDPK *in trans* verursachen. Ein alternativer Erklärungsansatz besteht darin, dass auch mögliche Substrate der CDPK in diesem Kompartiment lokalisiert sein müssen, um ein Signal in der Kaskade weiterzuleiten und letztendlich eine vollständige biologische Stress-Antwort bis hin zur Aktivierung eines HR-ähnlichen Zelltods zu bewirken.

Da aufgrund fehlender Analysen an gesamten CDPKs weiterhin keine gesicherte Struktur dieser Gruppe von Enzymen bekannt ist, können diese Ergebnisse nur mit publizierten NMR- und intramolekularen FRET-Daten für CLDs verglichen werden. Hierbei konnten Weljie *et al.* zeigen, dass ohne Chelatisierung von Calcium an den EF-Händen eine relativ „offene“ Protein-Struktur vorliegt, nach Ca^{2+} -Komplexierung eine geschlossenerere und erst nach Bindung an die Junction-Domäne die kompakteste Konformation (Weljie *et al.*, 2003; Weljie *et al.*, 2004; Weljie und Vogel, 2004). Das somit postulierte Modell einer geschlossenen Konformation der J und CLD-Domänen in aktivierter Form einer CDPK widerspricht nicht zwangsläufig der in dieser Arbeit detektierten Öffnung des vollständigen Proteins nach Einführung aktivierender Mutationen. Hierbei könnte die komprimierte Struktur der regulatorischen Domänen (J, CLD) nach Ca^{2+} -Komplexierung zu einem „Aufklappen“ des gesamten Enzyms unter Freigabe des Aktiven Zentrums der Kinase führen.

Hierfür spricht auch das Ergebnis der untersuchten Mutationen in den C-terminalen EF-Händen, für die eine wesentliche Bedeutung bei der Aktivierung durch ihre Bindung an J postuliert wird (Christodoulou *et al.*, 2004). Für diese EF-Hände konnten Christodoulou *et al.* eine Bindung an J im Grundzustand nachweisen, da diese zumindest im Fall von AtCPK1 bei cytosolischem Calcium-Niveau stets Ca^{2+} gebunden haben. Da die Sequenz-Homologie zwischen AtCPK1 und NtCDPK2 sowohl in den EF-Händen als auch in der gesamten CLD 92% beträgt, sind vergleichbare Ca^{2+} -Affinitäten zu vermuten. Daraus lässt sich postulieren, dass die in dieser Arbeit detektierte, veränderte Konformation der in den EF-Händen #3 und #4 mutierten NtCDPK2 im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 34) dadurch erfolgt, dass die C-terminale Region der CLD nicht mehr an J binden kann und die Kinase somit nicht mehr oder nur schwer aktivierbar ist. Daher ist zukünftig in einem weiteren Experiment der Einfluss solcher Mutationen auf die biologische Aktivität der CDPK zu untersuchen.

Weiterführende Analysen im SplitUB-System wären zudem von besonderem Interesse bei Kombinationen weiterer Mutationen in EF-Händen, wie z.B. #1 und #2, da Struktur-Daten zufolge für diese nur geringe Konformations-Änderungen in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Komplexierung zu erwarten sind (Weljie *et al.*, 2003), dies jedoch *in vivo* bislang nicht nachgewiesen werden konnte.

3.9 Ausblick

Zukünftig können in dem für Pflanzen entwickelten SplitUB-System andere CDPK-Isoformen untersucht werden, um Aussagen hinsichtlich ihrer Aktivitäts-abhängigen Konformation treffen zu können. Ein Ansatzpunkt besteht hier in der Betrachtung von homologen Enzymen aus *A. thaliana* (AtCPKs). Dabei sind insbesondere diejenigen zu favorisieren, welche eine deutliche, Stress-abhängige biochemische Aktivierung zeigen und für die folglich eine massive Änderung der Gesamt-Konformation zu erwarten ist. Dies scheint u.a. für die Isoform AtCPK2 der Fall zu sein, die bei transienter Expression in *N. benthamiana* einen klaren Shift nach Infiltration des bakteriellen Elizitors Flagellin aufweist (A.-C. Cazalé, M. Böhmer, T. Romeis, unveröffentlicht).

Zusätzlich könnte dieses SplitUB-Konstrukt auch transgen in *A. thaliana* zur Komplementation von AtCPK2-Mutanten eingebracht werden. Findet sich hierbei eine nachweisbare, deutliche Konformations-Änderung, könnte ein genetisches Selektions-Verfahren („screen“) entwickelt werden, mit dem in der Signalkette oberhalb der CDPK gelegene Komponenten gesucht werden können. Dazu muss das SplitUB-System derart verändert werden, dass die im Western-Blot detektierbare Differenz in der Abspaltungs-Rate des Reporters in einen selektierbaren Unterschied umzuwandeln ist. Hierfür kann an die Stelle des Dha z.B. ein Transkriptions-Faktor eingeführt werden, der erst nach Abspaltung von dem Membran-lokalisiertem Konstrukt in den Kern gelangen würde und damit die Transkription eines genetischen Selektions-Markers z.B. eines toxischen Gens wie Barnase steuern könnte (s. Abb. 44; Stagljar *et al.*, 1998). Die Verwendung eines solchen toxischen Gens hätte zudem den Vorteil, dass auch eine kurzfristige Aktivierung der CDPK langfristig sichtbar gemacht werden könnte. Darüber hinaus würde die Mutation der N-terminalen Aminosäure den Transkriptionsfaktor destabilisieren und somit eine Akkumulation des Reporters bereits vor Versuchsbeginn verhindern.

Als zusätzliche Absicherung des Systems könnten chemisch-induzierbare Transkriptions-Faktoren wie z.B. XVE (β -Estradiol-induzierbar; Zuo *et al.*, 2000) oder GVG (Dexamethason-induzierbar; Aoyama und Chua, 1997) verwendet werden, die für eine induzierte Überexpression toxischer Proteine entwickelt wurden. Dies hätte den Vorteil, dass der Marker erst während des Experiments und nicht eventuell vorher durch transiente Aktivierung der CDPK exprimiert wird.

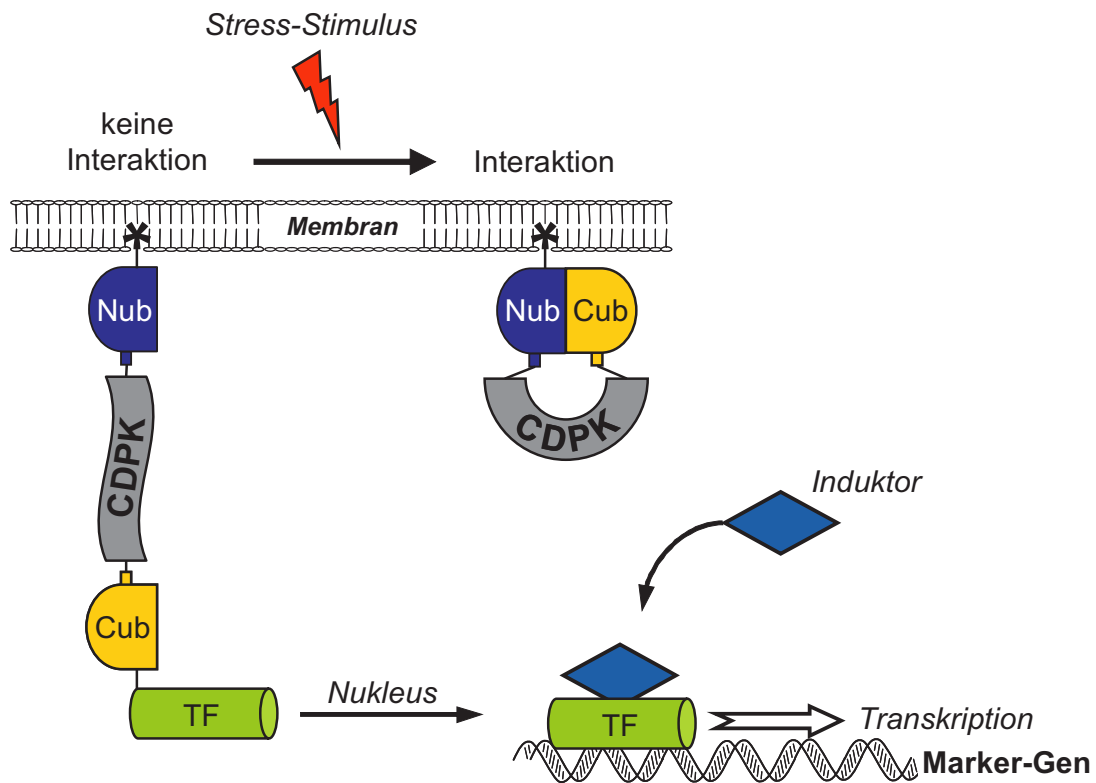


Abb. 44: Modell für ein genetisches Selektions-Verfahren auf Basis des SplitUB-Systems *in planta*. Ein Transkriptions-Faktor (TF) ist über das SplitUB-Konstrukt Membran-lokalisiert, der erst nach Konformations-Änderung der CDPK durch einem Stress-Stimulus und Interaktion der Ubiquitin-Hälften (Nub, Cub) abgespalten wird und in den Nucleus gelangen kann (nach Stagljar *et al.*, 1998). Eine Transkription des Reporters ist letztendlich nur nach Aktivierung durch einen applizierten chemischen Induktor möglich.

In der auf diese Weise generierten *A. thaliana*-Linie würde ein adäquater Stimulus zu einer Abspaltung des Transkriptions-Faktors führen, der daraufhin in den Zellkern gelangen und die Transkription des toxischen Gens erst nach zusätzlicher Applikation des chemischen Induktors induzieren könnte. Nach einer Mutagenese dieser Linie und beschriebenem Selektions-Verfahren würden somit nur Pflanzen überleben, in denen die Aktivierung der CDPK nicht erfolgt. Hiermit könnten z.B. in der Signalkaskade vorgeschaltete Rezeptoren, Kinasen oder Ca^{2+} -Kanäle aufgefunden werden.

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Detektion von Konformations-Änderungen der Calcium-abhängigen Protein-Kinase NtCDPK2 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*), die in Abhängigkeit eines Stress-Stimulus induziert werden. Da bislang weder Röntgen- noch NMR-Strukturen für ein Gesamt-Protein einer CDPK bekannt sind, sollten mit verschiedenen *in vivo*-Methoden Hinweise auf den biochemischen Reaktions-Mechanismus gesammelt werden.

Hierzu wurden zum einen intermolekulare Interaktionen einzelner CDPK-Domänen mit dem bereits in Hefe etablierten Split-Ubiquitin (SplitUB) System *in trans* untersucht. Zum anderen wurde das System auch für eine durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte, transiente Expression in der Tabak-Art *Nicotiana benthamiana* weiterentwickelt und erfolgreich angewandt. Dabei konnte eine Interaktion der Calmodulin-ähnlichen Domäne (CLD) mit der autoinhibitorischen Junction-Domäne (J) der CDPK nachgewiesen werden.

Auch das System der „*Bimolecular Fluorescence Complementation*“ wurde für die transiente Expression in *N. benthamiana* weiterentwickelt und konnte Interaktionen der N-terminalen Domänen (VKJ) mit der CLD nachweisen. Aufgrund stärkerer Hintergrund-Fluoreszenz konnte diese Methode nur Hinweise auf eine mögliche Stimulus-Abhängigkeit der Interaktionen liefern.

Neben den intermolekularen Wechselwirkungen wurden auch intramolekulare Interaktionen und somit die Gesamt-Konformation von Proteinen analysiert. Die hierzu verwendete Methode des „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET) *in cis* konnte eine Abhängigkeit der Konformation von der Struktur der Junction-Domäne *in planta* nachweisen. Zudem wurde das SplitUB-System *in cis* für die Anwendung in Pflanze weiterentwickelt. Hiermit konnte durch Analysen mutierter Formen von NtCDPK2 eine Abhängigkeit der Konformation von einer biologischen Funktionalität sowohl der Kinase-Domäne als auch von J aufgezeigt werden. Ebenso spielte die Calcium-Affinität der in der CLD lokalisierten EF-Hände eine zentrale Rolle. Diese Ergebnisse vervollständigten ein in der Literatur diskutiertes Aktivierungs-Modell für CDPKs. Aufgrund einer hohen Hintergrund-Abspaltung des Reporters konnten jedoch keine Aussagen über schnelle, dynamische Prozesse wie z.B. nach einer Stimulus-induzierten, transienten Aktivierung des Enzyms getroffen werden.

Das SplitUB-System wurde auch für Untersuchungen von Licht-abhängigen Konformations-Änderungen am Beispiel des Cryptochroms AtCRY2 aus *Arabidopsis thaliana* angewandt. Dieser UV-A- und Blaulicht-Rezeptor ließ einen eindeutigeren Nachweis erwarten, da eine konstante Aktivierung des Enzyms durch Lichteinstrahlung postuliert wird. Es konnte in dieser Arbeit erstmals die Licht-abhängige Konformations-Änderung eines Cryptochroms *in vivo* nachgewiesen werden. Das SplitUB-System erlaubte es hierbei im Gegensatz zu Untersuchungen an NtCDPK2, auch reziproke und dynamische Unterschiede nach Übergang in Dauerlicht- oder Dauerdunkel-Bedingungen zu detektieren.

5 Material

5.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

5.1.1 Mikroorganismen-Stämme

Für Klonierungen in *Escherichia coli* wurden folgende Stämme verwendet:

MACH1TM T1^R (Invitrogen, Karlsruhe)

$\Delta recA1398, endA1, tonA, \Phi80\Delta lacM15, \Delta lacX74, hsdR(r_k^- m_k^+)$.

Ein besonderer Vorteil dieses Stammes liegt im schnelleren Wachstum bei Ampicillin-Selektion.

DH10BTM (Invitrogen, Karlsruhe; Grant *et al.*, 1990)

F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, (Str^R) *nupG*.

Top10 (Invitrogen, Karlsruhe)

F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*, (Str^R), *nupG*.

GM2163 (New England Biolabs, Frankfurt)

ara-14, *leuB6*, *fhuA31*, *lacY1*, *tsx78*, *glnV44*, *galK2*, *galT22*, *mcrA*, *dcm-6* *hisG4*, *rfbD1*, *R(zgb210::Tn10)TetS*, *rpsL136*, *dam13::Tn9*, *xylA-5*, *mtl-1*, *thi-1*, *mcrB1*, *hsdR2*.

Für Methylierungs-sensitive Restriktions-Verdaue wurden Plasmide aus diesem Stamm isoliert, da er weder Dam- noch Dcm- Methylase besitzt.

DB3.1TM (Invitrogen, Karlsruhe)

F⁻, *gyrA462*, *endA*, $\Delta(sr1-recA)$, *mcrB*, *mrr*, *hsdS20*, ($r_B^- m_B^-$), *supE44*, *ara14*, *galK2*, *lacY1*, *proA2*, *rpsL20*(Str^R), *xyl5*, λ^- , *leu*, *mtl1*.

Dieser Stamm wurde für die Klonierung des GatewayTM-„Destination“-Vektors pXSG-NYCC benötigt, da er gegenüber dem toxischen *ccdB*-Gen resistent ist.

Zur Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde folgender Stamm verwendet.

JD53 (Dohmen *et al.*, 1995; Wittke *et al.*, 1999).

MATa his3-D200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-D63 ura3-52.

Für die transiente Expression in Pflanze wurden folgende Agrobakterien-Stämme verwendet:

GV3101::pMP90 (Koncz und Schell, 1986)

C58C1, Rif^R, Gm^R.

Dieser Stamm wurde nur für die Expression des p19-Silencing-Inhibitors aus dem Vektor 35S::p19 genutzt (Voinnet *et al.*, 2003).

GV3101::pMP90 RK (Koncz und Schell, 1986)

C58C1, Rif^R, Gm^R, Kan^R.

5.1.2 Pflanzen

Für transiente Expressionen wurden folgende Tabak-Arten verwendet:

Nicotiana benthamiana (Wildtyp),

Nicotiana tabacum cv. Petit Havana, transgen für *Cf-9* aus Tomate (Hammond-Kosack *et al.*, 1994).

5.1.3 Chemikalien und sonstige Materialien

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und sonstige Materialien.

Name	Bezugsquelle
Aceto-Syringon	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30 - 37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
AEBSF	
(4-(2-Aminoethyl)Benzenesulfonyl-Fluorid-Hydrochloride)	Labomedic (Bonn)
Agar BACTO [™]	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Agarose, peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
APS	Roth (Karlsruhe)
Avidin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
β-Glycerophosphat	Labomedic (Bonn)
BCIP	Roth (Karlsruhe)
Blottingpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calcium-Chlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cantharidin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Carbenicillin	Roth (Karlsruhe)
Chloral-Hydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DMF (Dimethylformamid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Bioline (Luckenwalde)
DTT (Dithiothreitol)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
EGTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Essigsäure (Eisessig)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)

FOA (5'-Fluoro-Orotat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gentamicin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hefeextrakt BACTO™	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Heringsperma-DNA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Histidin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
IPTG	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kalium-Acetat	Merck (Darmstadt)
Kalium-Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Kalium-Hydroxid	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Kupfer-Sulfat	Roth (Karlsruhe)
Lactophenol	NBS Biologicals (Huntingdon, Großbritannien)
Leucin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lithium-Acetat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesium-Chlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesium-Sulfat	Merck (Darmstadt)
Mangan-Chlorid	Merck (Darmstadt)
MES (2-(N-Morpholino)ethan H ₂ O Sulfonsäure)	Biomol (Hamburg)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Milch-Pulver, Blotting Grade	Roth (Karlsruhe)
MOPS	Biomol (Hamburg)
Natrium-Acetat	Merck (Darmstadt)
Natrium-Chlorid	Merck (Darmstadt)
Natrium-Fluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natrium-Hydroxid	Merck (Darmstadt)
Natrium-Vanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nitro-Blue-Tetrazolium	Roth (Karlsruhe)
Nitocellulose-Membran Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Orange G	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepton BACTO™	Becton Dickinson (San Jose, USA)
PhosphataseInhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Polyethylenglycol (PEG3350)	Merck (Darmstadt)
Ponceau S - Konzentrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rifampicin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rubidium-Chlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
SDS (Natrium-Lauryl-Sulfat)	Roth (Karlsruhe)
TCA (Tri-Chlor-Acetat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Invitrogen (Karlsruhe)
Triton®X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypanblau	NBS Biologicals (Huntingdon, Großbritannien)
Trypton BACTO™	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Tryptophan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween® 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Uracil	Sigma-Aldrich (Steinheim)
X-Gal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Yeast Nitrogen Base, Difco™, ohne Aminosäuren	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement (-His, -Leu, -Trp, -Ura), (-His) oder (-Ura)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

5.1.4 Kits

Tab. 5: Verwendete Kits.

Name	Bezugsquelle
GFX™ DNA Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
pENTR Directional TOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
pGEM®-T Easy	Promega (Madison, USA)

5.1.5 Enzyme, Proteine und Antikörper

Tab. 6: Verwendete Enzyme, Proteine und Antikörper.

Name	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase („shrimp“)	Roche (Penzberg)
Anti-c myc (Klon 9E10)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-HA High Affinity (Klon 3F10)	Roche (Penzberg)
Anti-mouse IgG, AP-Konjugat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-rat IgG, AP-Konjugat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA-Größenmarker Hyperladder I	Bioline (Luckenwalde)
DNA Topoisomerase I	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Gateway™ LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Molekulargewichts-Marker (Prestained Protein Marker, Broad Range)	New England Biolabs (Frankfurt)
Molekulargewichts-Marker (SeeBlue™ Plus2, Pre-Stained)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>PfuTurbo</i> ® DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Restriktions-Endonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt)
	Promega (Madison, USA)
<i>Strep</i> -Tactin®, AP-Konjugat	IBA (Göttingen)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen (Karlsruhe)

5.2 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, sind alle Puffer und Lösungen mit H₂O bidest. angesetzt.

AP-Puffer	100 mM Tris/HCl-Puffer pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl
	immer neu zugesetzt 0,5% (v/v) 25 mg/ml BCIP in DMF 0,5% (v/v) 5 % NBT in 70% DMF
Blotting-Puffer (konzentriert)	600 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,3 500 mM Glycin 1,5% SDS
Blotting-Puffer	8 % (v/v) konzentrierter Blotting-Puffer 20 % (v/v) Methanol

Chloralhydrat-Lösung	2,5 g/ml Chloralhydrat
DNA-Auftragspuffer (10x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF 0,2 % (w/v) Orange G 50 % (w/v) Saccharose 1 mM EDTA
HU-Puffer	8 M Harnstoff 5 % (w/v) SDS 200 mM Tris/HCl-Puffer pH 6,8 1 mM EDTA 0,4 % (w/v) Bromphenolblau immer neu angesetzt: obigen Puffer + 10 % (v/v) 1M DTT
IP-Puffer	25 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1 mM EGTA 1 mM AEBSF 1 µg/ml Aprotinin 2 µl/ml Proteinaseinhibitor Cocktail 1 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 5 mM β-Glycerophosphat
PEG-Lösung	8 ml 50% PEG 3350 1 ml 1M Lithium-Acetat 100 µl 1M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 20 µl 500mM EDTA mit H ₂ O auf 10 ml immer neu angesetzt, aus sterilen Komponenten
PCR-Puffer (10x)	500 mM KCl 100 mM Tris/HCl pH 9,0 15 mM MgCl ₂ 1% Triton [®] X-100
Protein-Extraktionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 5 mM EGTA 5 mM EDTA 2 mM DTT 1 mM AEBSF 1 µg/ml Aprotinin 2 µl/ml Proteinaseinhibitor Cocktail 10 mM NaF 10 mM Na ₃ VO ₄ 50 mM β-Glycerophosphat 0,5 % (v/v) Triton [®] X-100
Proteingel-Auftragspuffer (3x)	50 mM Tris/HCl-Puffer pH 6,8 30% (v/v) Glycerin 6 % (w/v) SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau immer neu angesetzt: obigen Puffer und 1M DTT, 2:1
Proteingel-Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris 0,1 mM EDTA mit 28,55% (v/v) Eisessig auf pH 8,5

TBS-Puffer (10x)	250 mM Tris/HCl pH 7,5 1 M NaCl
TBST-Puffer	10 % (v/v) 10x TBS Puffer 0,1 % (v/v) Tween20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 1 mM EDTA
Transformations-Puffer I	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,8; sterilfiltriert
Transformations-Puffer II	10 mM MOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin mit 1M NaOH auf pH 6,5; sterilfiltriert
Trypanblau-Färbelösung	33 ‰ (w/v) Trypanblau in Lactophenol immer neu angesetzt: obigen Puffer und 100% Ethanol, 1:1

5.3 Medien

5.3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Falls nicht anders angegeben, sind alle Medien mit H₂O bidest. angesetzt und autoklaviert worden. Für Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugegeben.

CR-Medium	2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) MgSO ₄ 0,074 % (w/v) KCl (10 mM)
LB-Medium	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1,0 % (w/v) NaCl mit 1M NaOH auf pH 7,0
SOB-Medium	2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,05 % (w/v) NaCl 18,6 ‰ (w/v) KCl (2,5 mM) mit 1M NaOH auf pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium + 5% (v/v) 2M MgCl ₂ (autoklaviert; f.c. 10 mM) + 16% (v/v) 1M Glukose (sterilfiltriert; f.c. 20 mM)

5.3.2 Medien zur Kultivierung von *A. tumefaciens*

Acetosyringon-Medium	10 mM MgCl ₂ 10 mM MES (auf pH 5,6 mit KOH) 150 µM Acetosyringon aus Stock-Lösungen immer neu angesetzt
LB-Medium	s. 5.3.1, Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>
YEB-Medium	0,5% (w/v) Fleisch-Extrakt 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) Pepton 0,5% (w/v) Saccharose 2 mM MgSO ₄ mit 1M NaOH auf pH 7,2

5.3.3 Medien zur Kultivierung von Hefe

Hefe Drop-Out Medium	20 g/l Glukose 6,7 g/l Yeast Nitrogen-base ohne Aminosäuren 1,4 g/l DropOut-supplement -His, -Leu, -Trp, -Ura oder 1,92 g/l DropOut-supplement -Trp oder 1,92 g/l DropOut-supplement -His falls nötig 380 mg/l Leucin falls nötig 30 mg/l Histidin falls nötig 50 mg/l Uracil falls nötig 76 mg/l Tryptophan
Hefe Minimal-Medium	wie Hefe Drop-Out Medium, aber ohne DropOut-supplement falls nötig, nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben: 1 mg/ml f.c. FOA (Stock in DMSO) 100µM f.c. CuSO ₄ (10 mM Stock)
YPD (Yeast Peptone Dextrose)	20 g/l Glukose 20 g/l Difco Pepton 10 g/l Hefe-Extract auf pH 5,8 eingestellt

5.4 Nukleinsäuren

5.4.1 Plasmide

Die erstellten Vektoren inklusive detaillierter Beschreibung der Klonierungen sind in den Methoden (Kapitel 6.4) aufgeführt.

Tab. 7: Liste der verwendeten Plasmide.

Name	Resistenz	Herkunft	Verwendung
pGEM[®]-T Easy	Ampicillin	Invitrogen (Cloning Kit)	Zwischen-Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten
pENTR[®]-D-Topo[®]	Kanamycin	Invitrogen (Cloning Kit)	Gateway [™] -Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten
pMet-AtMlo1-Cub-R-lacI⁺-HA-URA3	Ampicillin	Dr. R. Panstruga, Dr. C. Consonni ^a	Klonierung der SplitUB- <i>in trans</i> -Konstrukte und Kontrolle
pCup-HvCaM3-Cub-R-lacI⁺-HA-URA3	Ampicillin	Dr. R. Panstruga, Dr. C. Consonni ^a	Klonierung der SplitUB- <i>in trans</i> -Konstrukte und Kontrolle
pCup-Nub-p53-Cub-Dha	Ampicillin	(Johnsson, 2002)	Klonierung der SplitUB- <i>in cis</i> -Konstrukte
pCup-Nub-GUK1-Cub-Dha	Ampicillin	(Raquet <i>et al.</i> , 2001)	SplitUB- <i>in cis</i> -Kontrolle
pCup-Nub-FPR1 oder FPR1MC-Cub-Dha	Ampicillin	(Raquet <i>et al.</i> , 2001)	SplitUB- <i>in cis</i> -Kontrollen
pAMPAT-MCS	Ampicillin	Dr. R. Panstruga ^a , GenBank# AY436765	binäre Zielvektor für Klonierungen
pXCS-HAStrep NtCDPK2	Ampicillin	Dr. C.-P. Witte, Prof. Dr. T. Romeis ^a	Klonierung von pXS Nub-NtCDPK2(CLD)-HA
pXCS-HAStrep NtCDPK2(D241A)	Ampicillin	Dr. C.-P. Witte, Prof. Dr. T. Romeis ^a	Klonierung der Kinase-inaktiven Form NtCDPK2(D241A)
pXCS-HAStrep NtCDPK2(VK)	Ampicillin	Dr. C.-P. Witte, Prof. Dr. T. Romeis ^a	Klonierung von pXS Nub-NtCDPK2-VK-HA
pBIN19-NtCDPK2(J)-GFP-GFP	Kanamycin	Prof. Dr. T. Romeis ^a	Amplifikation von NtCDPK2(J)
pBIN19-NtCDPK2 (Jmut)-GFP-GFP	Kanamycin	Prof. Dr. T. Romeis ^a	Amplifikation von NtCDPK2(Jmut)
pSLJ13801	Kanamycin	(Romeis <i>et al.</i> , 2001)	Amplifikation verschiedener NtCDPK2-Versionen
pXCSTG-Strep NtCDPK2 (AA bzw. DD)	Ampicillin	S. Heimstädt, Dr. C.-P. Witte, Prof. Dr. T. Romeis ^a	Klonierung der Phosphorylierungs-Stellen-Mutationen AA bzw. DD
pSPYNE, pSPYCE	Kanamycin	(Walter <i>et al.</i> , 2004)	leere Vektoren für BiFC-Konstrukte
pSPYNE-AtCPRF2, pSPYCE-AtCPRF2	Kanamycin	(Walter <i>et al.</i> , 2004)	BiFC-Kontrollen
pXCSTG-CFP	Ampicillin	(Wiermer <i>et al.</i> , 2005)	Basis für pXSG-NYCC
pXNSG-YFP	Ampicillin	Dr.N.Medina-Escobar Prof. Dr. J. Parker ^a	Basis für pXSG-NYCC
p35S:p19	Kanamycin	(Voinnet <i>et al.</i> , 2003)	Silencing-Suppressor p19

a: MPIZ Köln

5.4.2 Oligonukleotid-Primer

Die Primer wurden kommerziell erworben (Fa. Operon, Köln; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) oder von ADIS bereitgestellt.

Tab. 8: Liste der Primer.

Primer- Nummer	Funktion	Richtung	Sequenz ^a
TR 001 ^b	pXS Sequenzierung aus 35S-Promotor	forward	AAGGAAGTTCATTTTCATTTG
TR 002	pXS und pXA Sequenzierung aus 35S-Terminator	reverse	AGCGAAACCCCTATAAGAA
TR 098	BamHI - NtCDPK2(V), Klonierung hinter Nub	forward	CGGGATCCCAGGGGAT ATG GGGAACAC TTGTGTTGG
TR 054	Gateway TM -Klonierung NtCDPK2(CLD)	reverse	AAGTCTTAGAGCCTCTCT
TR 099	Sall - NtCDPK2(J), Klonierung vor Cub	reverse	GCGTCGACCCGATGACTCTCAAAGCCA T
TR 100	EcoRI - HA-Tag, Klonierung hinter Nub NtCDPK2(VK, CLD)-HA	reverse	GGAATTCAGC a TAATCTGGAACATCG
TR 101	EcoRI - ATG - NtCDPK2(J), Klonierung vor Cub	forward	GGAATTC ATG GCACCAGATAAGCCTCT GG
TR 194	Sequenzierung M13 unil	forward	CGTTGTAAAACGACGGCCAGT
TR 195	Sequenzierung M13 revl	reverse	CAGGAAACAGCTATGACCATG
TR 247	Mutation J nach Jmut	forward	GAGTCGAATG gc ACAA gc TTCTGCAAT GAACAAGCTC gc GAAAATGGC
TR 248	Mutation J nach Jmut	reverse	GCCATTTTC gc GAGCTTGTTCATTGCA GA agc TTGT gc CATTCGACTC
TR 257	Sequenzierung aus Nub	forward	ACATTGGAAGTTGAATCTTCCG
TR 258	Sequenzierung aus Cub	forward	GTAAGCAGCTAGAAGACGGTAG
TR 259	Sequenzierung aus Cub	reverse	CACAAGATGTAAGGTGGAC a CC
TR 262	EcoRI - Nub, Klonierung Nub in pAMPAT-MCS	forward	GGAATTCAAAA ATG CAGATTTTTCGTCAA G
TR 274	BamHI - NtCDPK2(CLD), Klonierung hinter Nub	forward	CGGGATCCCAGGGGATGCCGAAAGCCT ATCTGAAG
TR 280	EcoRI - NtCDPK2(J), Klonierung NtCDPK2 (J)-Cub-R-lacI'-HA in pAMPAT-MCS	forward	GGAATTCATA ATG GCACCAGATAAGCC
TR 281	XmaI - HA, Klonierung NtCDPK2(J)-Cub-R- lacI'-HA in pAMPAT-MCS	reverse	CCCCCGGGAAGGAAAGCGGCGTAATC
TR 305	SmaI - ATG - NtCDPK2(J), Klonierung in pSPYCE/pSPYNE	forward	TCCCCCGGG ATG GCACCAGATAAGCCT CTGG
TR 306	Sall - NtCDPK2(J), Klonierung in pSPYCE/pSPYNE	reverse	GCGTCGACGATGACTCTCAAAGCCAT
TR 307	BamHI - ATG - NtCDPK2(CLD), Klonierung in pSPYCE/pSPYNE	forward	CGGGATCCCAGGGGAT ATG GCCGAAAG CCTATCTGAAG
TR 316	Sall - NtCDPK2(CLD), Klonierung vor Cub	reverse	GCGTCGACCCAAGTCTTAGAGCCTCTC
TR 356	EcoRI - Stop-Codon - HA-Tag, Klonierung SplitUB-NtCDPK2 in pAMPAT-MCS	reverse	GGAATTC TTA TAAAAATGCAGCG
TR 395	XhoI - NtCDPK2(V), Myristoylierungs-Sequenz	forward	GATATCCTCGAGAAA ATG GGGAACACT TG
TR 396	HindIII - NtCDPK2(V), Myristoylierungs-Sequenz	reverse	CATTGCAAAGCTTACTGACTGAAAAAG ACC

TR 434	Gateway TM - NtCDPK2(V) Klonierung in pXCAG ohne *Nub	forward	CACC ATG GGGAACACTTGTGTTGGAC
TR 445	Gateway TM - EcoRI - NtCDPK2(V), Klonierung SplitUB-Konstrukt	forward	CACC <u>GAATTC</u> GAGAAAA ATG GGGA ACACTTG
TR 446	Gateway TM - EcoRV - Dha, Klonierung SplitUB-Konstrukt	reverse	AAAGATATCGTAATCTGGAACATCGTA TGG
TR 520	Sequenzierung nur aus YFP, <u>nicht</u> CFP (für pXSG-NYCC)	forward	TCGTGACCACCTTCGGCTAC
TR 521	Sequenzierung nur aus CFP, <u>nicht</u> YFP (für pXSG-NYCC)	reverse	CACTGCACGCCCCAGGTCAG
TR 522	NtCDPK2(J), Gateway TM - Klonierung von NtCDPK2(VKJ oder Jmut)	reverse	GATGACTCTCAAAGCCATTTTC
TR 523	Gateway TM - ATG - NtCDPK2(J), Klonierung von NtCDPK2(J oder JmutCLD)	forward	CACC ATG GCACCAGATAAGCCTC
TR 647	Mutation NtCDPK2-EF-Hand #3 (E514Q), Einführen von PvuII	forward	CCGCAGACC <u>agct</u> GCAACAAGCTTGTG AGG
TR 648	Mutation NtCDPK2-EF-Hand #4 (E548Q), Einführen von MscI	reverse	CTTTTGCATCAT <u>gGCc</u> ACGAACTgATT GTAATC
TR 657	Gateway TM - ohne ATG - GUK1, Klonierung in pXSG-NYCC	forward	CACC TCCCGTCCTATCGTAATTTTC
TR 658	GUK1, Klonierung in pXSG-NYCC	reverse	TTTTTCTGCAAAGATAAAAATC
TR 659	Gateway TM - ohne ATG - FPR1 und FPR1MC, Klonierung in pXSG-NYCC	forward	CACC TCTGAAGTAATTGAAGGTAAC
TR 660	FPR1, Klonierung in pXSG-NYCC	reverse	GTTGACCTTCAACAATTCGAC
TR 661	FPR1MC, Klonierung in pXSG-NYCC	reverse	TTGACCTTCAACAATTCGACG
OAN (ADIS)	Marburg OAN129, Sequenzierprimer aus GFP, CFP und YFP	reverse	TTTACGTCGCCGTCCAGC
nosT (ADIS)	Sequenzierprimer aus Nos-Terminator	reverse	GCAAGACCGGCAACAGGATT
P35S (ADIS)	Sequenzierung aus 35S-Promotor	forward	ACAATCCCCTATCCTTC
T35S (ADIS)	Sequenzierung aus 35S-Terminator	reverse	TCTGGGAACACTACTCACAC

a: unterstrichen = zur Klonierung verwendete Restriktionsenzym-Schnittstellen; fett gedruckte Großbuchstaben = Start- bzw. Stop-Codons; fett gedruckte, kleine Buchstaben = „mismatches“ zur Einführung von Mutationen. b: Grau hinterlegt sind Primer, die in erster Linie zur Sequenzierung erstellt und verwendet wurden, inklusive der von ADIS bereitgestellten (OAN, nosT, P35S, T35S).

6 Methoden

6.1 Kultivierung von Mikroorganismen

6.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Über-Nacht-Kulturen (ÜNKs) von *E. coli* wurden in autoklaviertem LB-Medium bei 37°C angezogen. Dem Medium wurden, wenn nötig, folgende Antibiotika zugesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml. Zur Kultivierung auf Festmedium wurde LB-Agar verwendet, wenn nötig mit Antibiotika. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ÜNKs mit 50% Glycerin im Verhältnis 2:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

6.1.2 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Kulturen von *A. tumefaciens* wurden in YEB-Flüssigmedium dicht angeimpft und 16 h bei 28°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Als Festmedium wurde YEB-Agar gewählt. Folgende Antibiotika wurden entsprechend der Stämme und Plasmide zugegeben: Carbenicillin 50-75 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Gentamycin 15 µg/ml, Rifampicin 100 µg/ml. Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit 50% Glycerin im Verhältnis 2:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

6.1.3 Kultivierung von Hefe

Hefekulturen wurden in YPD-Flüssigmedium, Drop-Out Medium oder Minimal-Medium für 16 h bei 30°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Als Festmedium wurde der entsprechende Agar gewählt. Entsprechend der Auxotrophie-Marker der transformierten Plasmide wurden dem Drop-Out und Minimal-Medium Aminosäuren zugegeben. Zur Induktion der Expression von Proteinen aus dem Vektor pCup wurde eine ÜNK auf ein OD₆₀₀ von 1,0 gebracht und mit 100 µM CuSO₄ versetzt. Nach einer Stunde wurden Proben für eine Protein-Extraktion entnommen. Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit 50% Glycerin im Verhältnis 2:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

6.2 DNA-Arbeiten

6.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Aufreinigung von Vektor-DNA aus ÜNKs erfolgte mit dem GFX™ Mini-Prep. Kit (Fa. Amersham) nach Angaben des Herstellers.

6.2.2 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Innis und Gelfand, 1990). Durch die Wahl der Primersequenz mit gezielten Basenaustauschen („*mismatches*“) können Änderungen im Amplifikat erzeugt werden, die z.B. eine neue Erkennungsstelle für Restriktions-Endonukleasen darstellen oder die Aminosäure-Sequenz gezielt verändern (Innis und Gelfand, 1990).

Reaktions-Ansatz (25 µl):

- 2,5 µl 10x Taq- oder Pfu-Puffer
- 1,0 µl dNTPs (10 mM; f.c. 0,4 mM)
- je 1,0 µl 10 mM Primer (0,4 mM)
- 0,25 µl Taq-Polymerase (ca. 0,5 units/µl) bzw. Pfu-Polymerase (2,5 units/µl)
- 10-100 ng DNA-Matrize
- mit H₂O auf 25 µl Endvolumen

Die Wahl der Anlagerungs-Temperatur richtete sich nach der vom Hersteller der Oligo-Nukleotide angegebenen Schmelztemperatur (T_m). Es wurde in der Regel eine Temperatur gewählt, die um 5°C unter der T_m des kürzeren Primers lag. Bei „*mismatches*“ wurde die Temperatur entsprechend der Anzahl nicht hybridisierender Basen nach unten korrigiert. Die Elongationsdauer wurde mit 1-2 min je 1 kb Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt, mindestens jedoch 30 s.

PCR-Programm:

	1 min,	95°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt	
20-25x	{	15 s,	95°C	Denaturierung
		45 s,	40-70°	Anlagerung der Primer
		1-2 min je 1 kb,	72°C	Elongation
	5 min,	72°C	finale Polymerisation	

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Mittels PCR konnte auch die korrekte Klonierung eines Konstrukts noch bereits vor Isolierung der Plasmid-DNA überprüft werden. Hierzu wurde für eine so genannte Kolonie-PCR (cPCR) mit einer sterilen Pipetten-Spitze in eine Bakterien-Kolonie gestochen und die anhaftenden Zellen in einem PCR-Ansatz resuspendiert. Die PCR-Reaktion erfolgte wie bereits zuvor beschrieben.

6.2.3 Zielgerichtete Mutagenese

Die gezielte Einführung von Punkt-Mutationen wurde mit unterschiedlichen Protokollen vorgenommen. Die erste Methode ist dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Fa. Stratagene nachempfunden. Dabei wurden vorwärts (fwd)- und rückwärts (rev)-Primer mit der entsprechenden mutierten Region so gewählt, dass 10-15 Basen neben den „mismatches“ vorhanden waren, die Gesamtlänge bei 25-45 Basen lag, der G/C-Gehalt größer als 40% und T_m größer als 78°C war (Formel: $T_m = 81,5 + [0,41 \cdot \% \text{ G/C-Gehalt}] - [675 / \text{Gesamtlänge in bp}] - \% \text{ „mismatches“}$). Mindestens ein G oder C sollte am 3'-Ende der Primer liegen. In einer PCR wurde das gesamte Plasmid von beiden Primern amplifiziert. Als Elongationsdauer wurden 2 min je 1 kb Länge des Plasmids gewählt.

Reaktions-Ansatz (25 µl):

2,5 µl 10x Pfu-Puffer
 2,0 µl dNTPs (10 mM; f.c. 0,8 mM)
 je 0,7 µl 10 mM Primer (f.c. 0,28 mM)
 0,5 µl *PfuTurbo*®-Polymerase (2,5 units/µl)
 10 ng DNA-Matrize
 mit H₂O auf 25 µl

	1 min,	94°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt	
18x	{	25 s,	94°C	Denaturierung
		1 min,	50°C	Anlagerung der Primer
		2 min je 1 kb,	68°C	Elongation

Die DNA wurde dann mit 0,5 µl des Restriktions-Enzyms DpnI (20 u/µl) für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde nur die ursprüngliche DNA geschnitten, da sie durch *E. coli* methyliert war und DpnI nur methylierte DNA erkennt. Die in der PCR neu entstandenen Plasmid-Fragmente wurden folglich nicht geschnitten und konnten nach Transformation in *E. coli* ligiert und zum vollständigen, mutierten Plasmid zusammengefügt werden (s. Abb. 45).

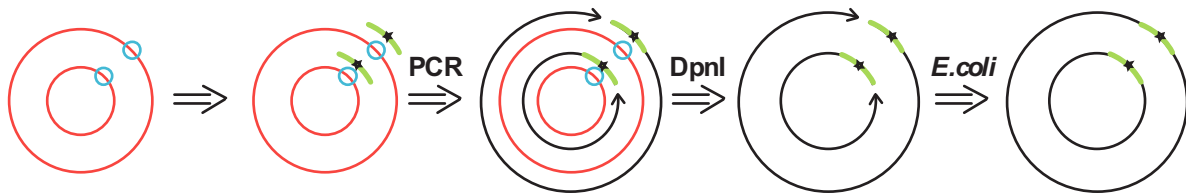


Abb. 45: Mutagenese-PCR von Plasmiden. rot = ursprüngliches Plasmid; blau = wt-Base; grün = Mutagenese-Primer; ★ = mutierte Base; schwarz = re-amplifiziertes Plasmid (nach QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, Fa. Stratagene)

Zum vereinfachten Auffinden von Klonen mit korrekt mutiertem Plasmid durch cPCR wurden wenn möglich neue Restriktionsenzym-Schnittstellen durch stille Mutationen eingefügt („*silent sites*“) oder vorhandene entfernt. So konnte schon ein Amplifikat aus einer cPCR, die die mutierte Region überspannte, durch Restriktions-Verdau auf die Mutation überprüft werden. Da weitere Mutationen im restlichen Plasmid nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde der mutierte Bereich sequenziert und die mutierte und bestätigte Sequenz in den Ursprungsvektor re-kloniert.

In einer alternativen Methode, die arbeitsaufwändiger aber schneller war, wurden selbige Mutagenese-Primer wie oben beschrieben eingesetzt, jedoch in zwei einzelnen PCRs mit jeweils einem anderen außerhalb der zu mutagenisierenden Region bindenden Primer. So wurden zunächst zwei kleinere Fragmente amplifiziert und aufgereinigt. Da diese im Bereich der Mutation überlappten, konnten sie in einer weiteren PCR einander als Primer für die Amplifikation eines größeren Fragments dienen. Nach erneuter Aufreinigung und wiederholter PCR mit den außen gelegenen Primern zur Generierung von genügend DNA wurde das amplifizierte Fragment mit Restriktionsenzymen neben den Mutationen geschnitten und in das ebenso geöffnete Ursprungs-Plasmid ligiert (s. Abb. 46).

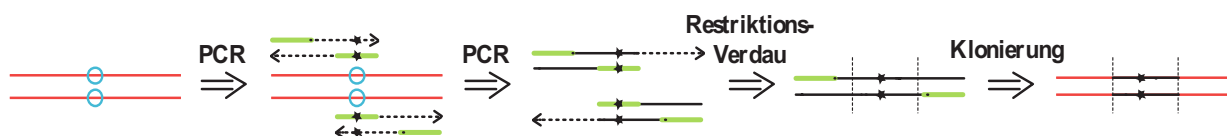


Abb. 46: Stufenweise PCR-Mutagenese. rot = ursprüngliche DNA; blau = wt-Base; grün = Primer; ★ = mutierte Base; schwarz = amplifizierte DNA

6.2.4 Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firma New England Biolabs (Frankfurt) nach Herstellerangaben verwendet. Bei Verwendung mehrerer Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem die Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch unspezifische Aktivitäten aufzuweisen.

6.2.5 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung einer Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation wurden die 5'-Enden durch alkalische Phosphatase aus Krabben (SAP) dephosphoryliert. Dazu wurden 26 µl DNA-Lösung mit 3 µl 10x SAP-Puffer und 1 µl SAP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 20 min auf 65°C erhitzt.

6.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder auch mehrerer DNA-Fragmente ist mit T4-DNA-Ligase möglich. Für die Ligation von Fragmenten in ein geöffnetes Plasmid wurden 100 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit 2 µl 5 x Ligase-Puffer, 0,5 µl T4-DNA-Ligase (Komponenten der Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und bis zu 7,5 µl Lösung der zu klonierenden Fragmente vermengt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 4°C wurde das Enzym für 20 min bei 65°C inaktiviert und wenige Mikroliter des Ansatzes in chemo-kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

6.2.7 GatewayTM-Klonierungen

Für die vereinfachte Klonierung von mehreren Genen oder Fusionskonstrukten in unterschiedliche Vektoren wurde das GatewayTM-System der Fa. Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde das gewünschte Konstrukt mittels PCR amplifiziert und am 3'-Ende über Primer die Sequenz „CACC“ vor dem Start-Codon eingeführt. Mithilfe dieser Sequenz konnte das PCR-Amplifikat in den so genannten „ENTRY“-Vektor pENTR/D-TOPO[®] in gezielter Orientierung ligiert und anschließend sequenziert werden. Über eine „LR-Reaktion“ nach Angaben des Herstellers (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) wurde es dann in den „Destination“-Vektor übertragen. Nach Transformation weniger Mikroliter der Reaktion in *E. coli* konnten nur transformierte Zellen überleben, bei deren Plasmid das in der GatewayTM-Kassette enthaltene, toxische *ccdB*-Gen durch den gewünschten ORF des „ENTRY“-Vektors ersetzt wurde.

6.2.8 pGEM[®]-T - Klonierungen

Die Zwischen-Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem pGEM[®]-T Kit der Firma Promega (Madison, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei diente der durch die

Taq-Polymerase erzeugte 3'-A-Überhang zur Ligation in den Vektor mit 3'-T-Überhang. Das Konstrukt konnte anschließend mit den Primern TR194 und TR195 sequenziert werden.

War hingegen das PCR-Produkt mit Pfu-Polymerase amplifiziert worden, musste für die Klonierung ein zusätzlicher Schritt vorgeschaltet werden: Da die Pfu-Polymerase keinen A-Überhang generiert, wurde in einer so genannten „*A-tailing*“ Reaktion mit Taq-Polymerase ein Adenin-Nukleotid angehängt. Hierzu wurden das PCR-Produkt, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,1 µl dATP (100 mM) und 0,1 Taq-Polymerase mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt und für 5-10 min bei 72°C inkubiert. Danach konnte nach Herstellerangaben mit dem Kit fortgefahren werden.

6.3 Analyse von DNA

6.3.1 DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde DNA-Lösung im Verhältnis 1:100 mit H₂O verdünnt und mittels UV-Spektrometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) in UV-durchlässigen Küvetten (Fa. Eppendorf, Hamburg) analysiert.

6.3.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in Taschen von Agarose-Gelen gegeben (0,8 - 2,0% Agarose, 1x TAE-Puffer, Ethidiumbromid f.c. 0,2 µg/ml). Als Größen-Standard diente der Größenmarker Hyperladder I der Firma Bioline (Luckenwalde). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 25 – 100 V. Da sich Ethidiumbromid in die DNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurden der QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden) und der GFX[™] DNA Purification Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Herstellerangaben verwendet.

6.3.3 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxy-Ribonukleotide angewandt (nach Sanger *et al.*, 1977). Die Proben wurden von ADIS (Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung / DNA core facility) am MPIZ, Köln auf den Geräten Abi Prism 377, 3100 und 3730 mit BigDye-terminator v3.1 chemistry (jeweils

Applied Biosystems, Weiterstadt) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Sequencher (Demo-Version 4.2, Fa. Gene Codes Corporation) überprüft.

6.4 Plasmid-Konstrukte

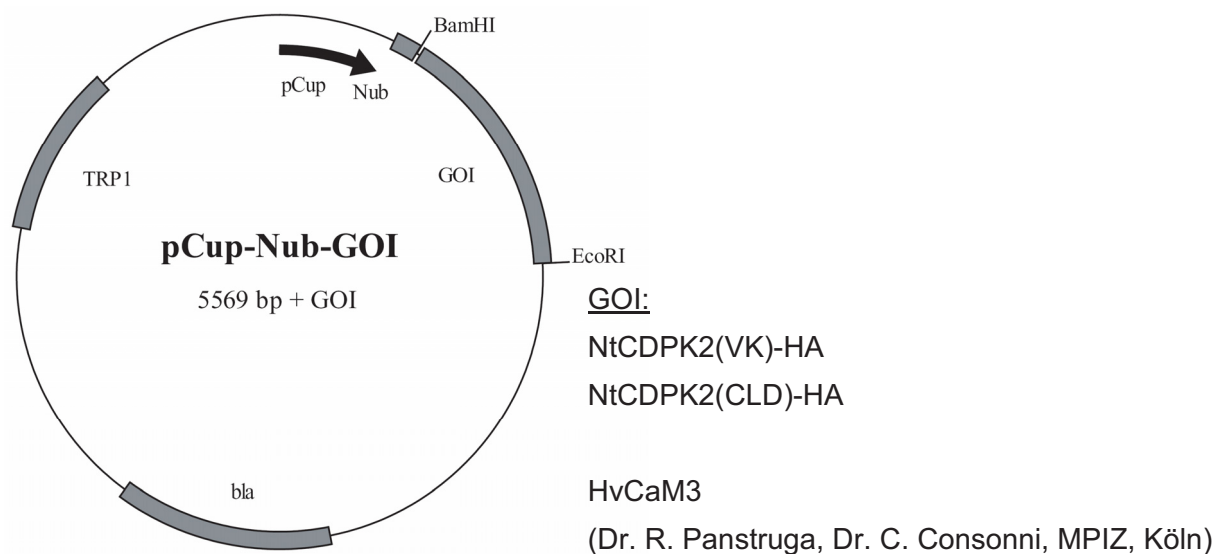
Im Folgenden werden die Klonierungsschritte zur Generierung der unterschiedlichen Plasmide beschrieben. Dabei wird in der Regel auf die Darstellung jedes einzelnen Vektors mit dem jeweiligen klonierten Genen verzichtet und stattdessen das Plasmid mit einem fiktiven Gen („*gene of interest*“, GOI) von 1 kb Länge gezeigt. Die Gesamtgröße ergibt sich aus der angegebenen Größe zuzüglich der des klonierten GOIs. Es werden lediglich die wichtigsten Restriktionsenzym-Schnittstellen, Promotoren (schwarzer Pfeil), sowie ORFs und Selektions-Marker (grauer Kasten) dargestellt. Falls nicht anders angegeben enthielten die gezeigten Vektoren das β -Lactamase-Gen *bla* für eine Ampicillin-Resistenz als Selektions-Marker.

Die Bezeichnung der binären Hefe-Plasmide richtet sich nach dem Promotor, welcher vor dem SplitUB-Konstrukt lag. Die Nomenklatur der binären Agrobakterien-Plasmide basierend auf dem Vektor pAMPAT-MCS („*accession number*“ AY436765) war wie folgt: Allgemeine Bezeichnung pX, gefolgt von C oder N (C- oder N-terminale Fusion des Epitoptags bzw. Fusionsproteins), S oder A (35S- bzw. pAlcA-Promotor), G (GatewayTM-kompatibel). Nach einem Bindestrich folgt die Bezeichnung des Epitoptags bzw. Fusionsproteins und nach anschließendem Leerzeichen der klonierte ORF (nach Witte *et al.*, 2004).

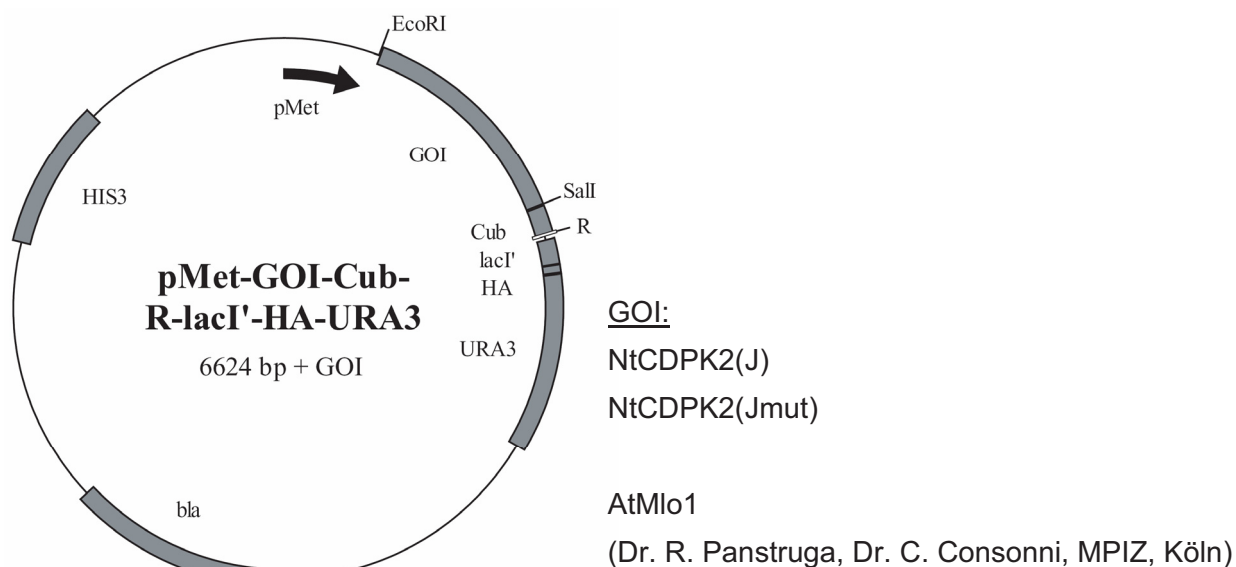
6.4.1 SplitUB-Konstrukte für Hefe, *in trans*

Für das Plasmid pCup-Nub-NtCDPK2(VK)-HA wurden die Variable und die Kinase-Domäne inklusive des HA-Tags aus dem Vektor pBIN19-NtCDPK2(VK)-HA mit den Primern TR 098 und TR 100 amplifiziert. Über die durch die Primer eingeführten BamHI und Sall-Schnittstellen wurde das Fragment in den ebenso geöffneten Vektor pCup-Nub-HvCaM3 (Ralph Panstruga, Chiara Consonni) kloniert, wobei das Calmodulin-Gen HvCaM3 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) ersetzt wurde. Das Plasmid enthielt den Auxotrophie-Marker TRP1, auf den in Hefe selektiert werden konnte, den Kupfer-induzierbaren Promoter pCup vor dem ORF und die Wildtyp-Nub-Variante mit Isoleucin an den Positionen 3 und 13.

Gleichermaßen wurde die CLD mit HA-Tag aus pBIN19-NtCDPK2-HA mit den Primern TR 274 und TR 100 amplifiziert. Zusätzlich wurde ein Start-Codon vor die CLD eingebracht. Über die gleichen Restriktionsenzym-Schnittstellen wurde somit pCup-Nub-NtCDPK2(CLD)-HA generiert.

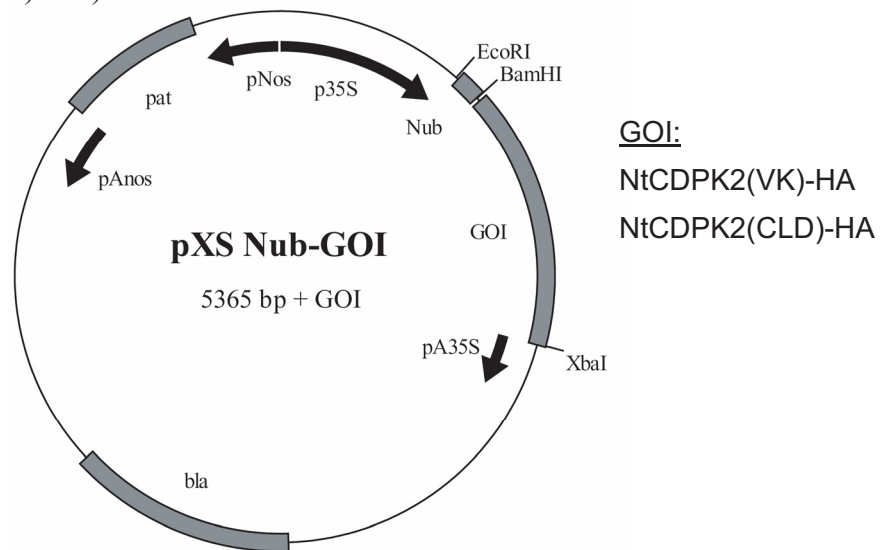


Über die Primer TR 101 und TR 099 wurde die Junction-Domäne von NtCDPK2 in wt und mutierter Version aus dem Plasmid pBIN19-NtCDPK2(J)-GFP-GFP bzw. pBIN19-NtCDPK2(Jmut)-GFP-GFP amplifiziert (Prof. Dr. T. Romeis, MPIZ, Köln). Über die Restriktionsenzym-Schnittstellen EcoRI und Sall, die durch die Primer zusammen mit einem Start-Codon eingeführt wurden, konnte die Junction-Domäne in den ebenso geöffneten Vektor pMet-AtMlo1-Cub-R-lacI'-HA-URA3 (bereitgestellt von Dr. R. Panstruga und Dr. C. Consonni; Kim *et al.*, 2002) kloniert und das AtMlo1-Gen ersetzt werden. Das Plasmid enthielt neben dem Methionin-reprimierbaren Promotor pMet einen Hefe-Marker für Histidin. Neben den so entstandenen Vektoren pMet-NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA-URA3 und pMet-NtCDPK2(Jmut)-Cub-R-lacI'-HA-URA3 wurde das Plasmid pMet-AtMlo1-Cub-R-lacI'-HA-URA3 als Kontrolle verwendet.

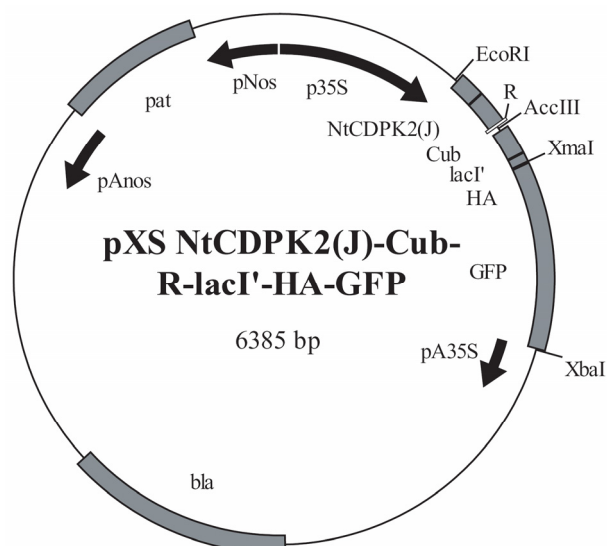


6.4.2 SplitUB-Konstrukte für Pflanze, *in trans*

Zur Expression der SplitUB-Fusionsgene in *N. benthamiana* wurde Nub aus einem pCup-Nub Vektor in den binären, pAMPAT-MCS-basierten Vektor pX umklontiert. Dazu wurde Nub mit den Primern TR 262 und TR 100 amplifiziert und mit den u.a. über die Primer eingeführten Schnittstellen EcoRI und NcoI in den ebenso geöffneten Vektor pXCS-HA NtCDPK2(VK) ligiert. In das entstandene Plasmid pXS Nub-NtCDPK2(VK)-HA wurde wiederum die CLD-kodierende Sequenz über BamHI und XbaI kloniert, welche mit selbigen Enzymen aus dem Vektor pCup-Nub-NtCDPK2(CLD)-HA isoliert worden war (pXS Nub-NtCDPK2(CLD)-HA).



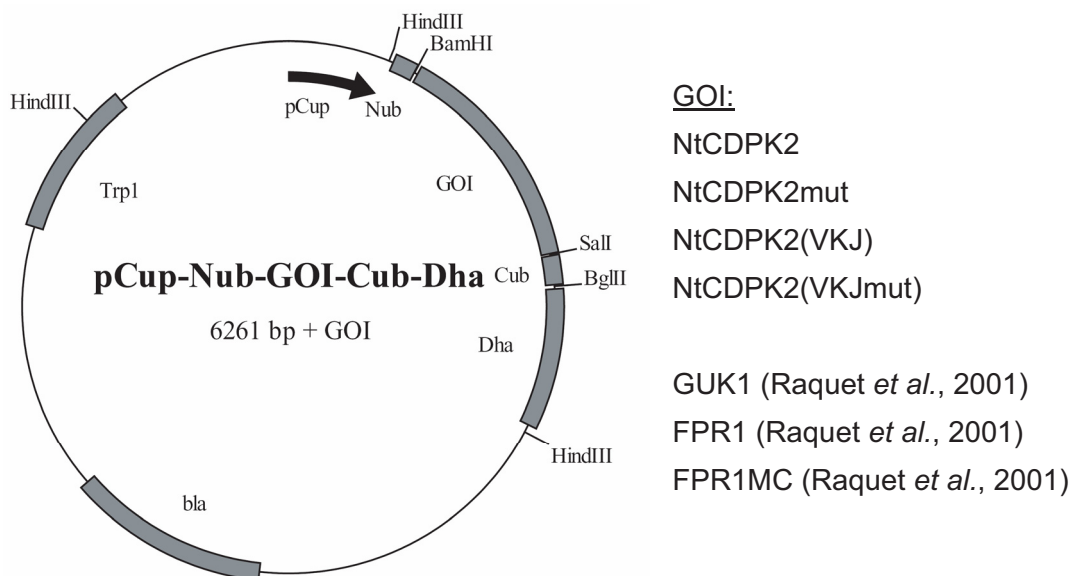
Als Reporter-Konstrukt für das SplitUB-System *in planta* wurde das Fragment NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA aus dem Vektor pMet-NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA-URA3 über die Primer TR 280 und TR 281 amplifiziert. Über die Schnittstellen XmaI und EcoRI wurde es dann in den binären Vektor pXCS-GFP kloniert (pXS NtCDPK2(J)-Cub-R-lacI'-HA-GFP).



Durch enzymatische Öffnung dieses Plasmids mit AccIII und XmaI und anschließende Religation der kompatiblen Enden wurde das lacI'-HA-Fragment (165 bp) entfernt und somit der Vektor pXS NtCDPK2(J)-Cub-R-GFP generiert.

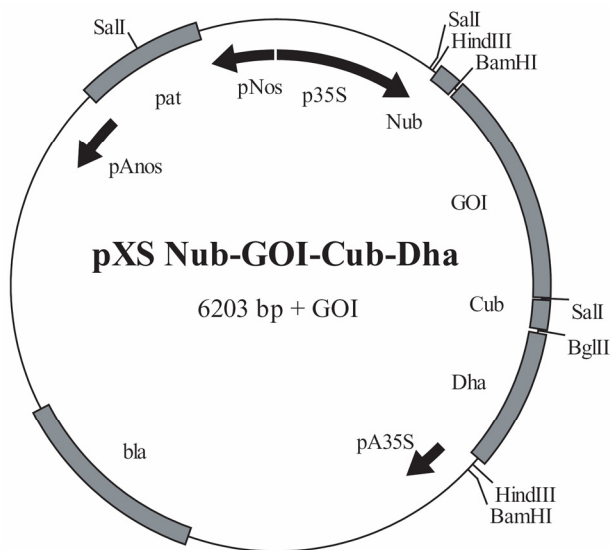
6.4.3 SplitUB-Konstrukte für Hefe, *in cis*

Die bei der Konformations-Untersuchung verwendeten SplitUB-Vektoren basierten auf dem von Dr. N. Johnsson (Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruhe) zu Verfügung gestellten Vektor pCup-Nub-p53-Cub (Johnsson, 2002), aus dem das p53-Gen über die Restriktionsenzym-Schnittstellen BamHI und SalI deletiert wurde. Der Vektor enthielt die mutierte Nub-Variante Nvg (I3V, I13G), die schwächer als die wt-Form mit Cub interagiert. Zur Klonierung der CDPK-Versionen wurden ORFs von NtCDPK2 über die Primer TR 098 und TR 316 bzw. NtCDPK2(VKJ) mit TR 098 und TR 099 amplifiziert. Über die durch die Primer eingeführten Restriktions-Schnittstellen BamHI und SalI konnten die Konstrukte in den zuvor genannten, geöffneten pCup-Vektor ligiert werden. Die in J mutierten Varianten wurden aus den erhaltenen Vektoren mittels Mutagenese-PCR mit den Primern TR 247 und TR 248 generiert. Als Kontrollen wurden in selbigem Vektor die Hefe-Gene GUK1, FPR1 und FPR1MC von Dr. N. Johnsson bereitgestellt (Raquet *et al.*, 2001).



6.4.4 SplitUB-Konstrukte für Pflanze, *in cis*

Zur transienten Expression in *N. benthamiana* sollten die Kontrollen der Hefe-Gene in den binären Vektor pAMPAT-MCS kloniert werden, der neben dem konstitutiven 35S-Promotor vor der „Multiple Cloning Site“ (MCS) auch das *pat*-Gen für eine Basta-Selektion in Pflanzen enthält. Hierzu wurden die ORFs der zuvor genannten *in cis*-Hefe-Plasmide mit dem Restriktions-Enzym HindIII isoliert und in den ebenso geöffneten Vektor pAMPAT-MCS ligiert. Die Orientierung konnte mittels Sequenzierung bestätigt werden.



GOI:

GUK1

FPR1

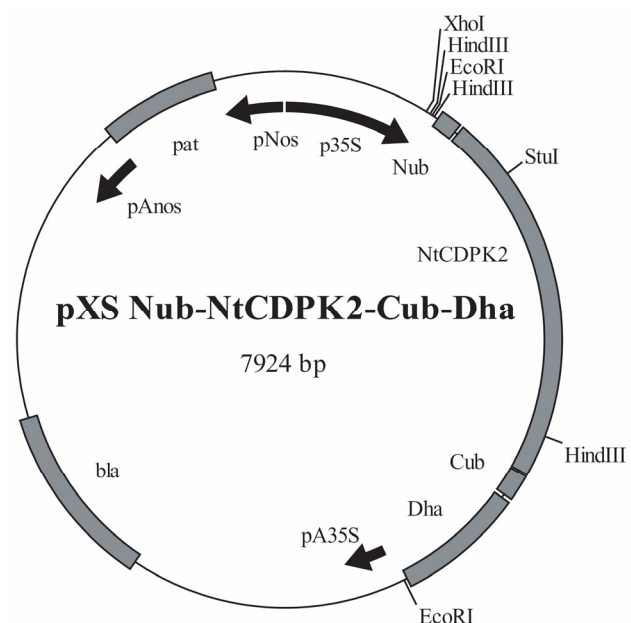
FPR1MC

AtCry2

AtCry2 Q612K

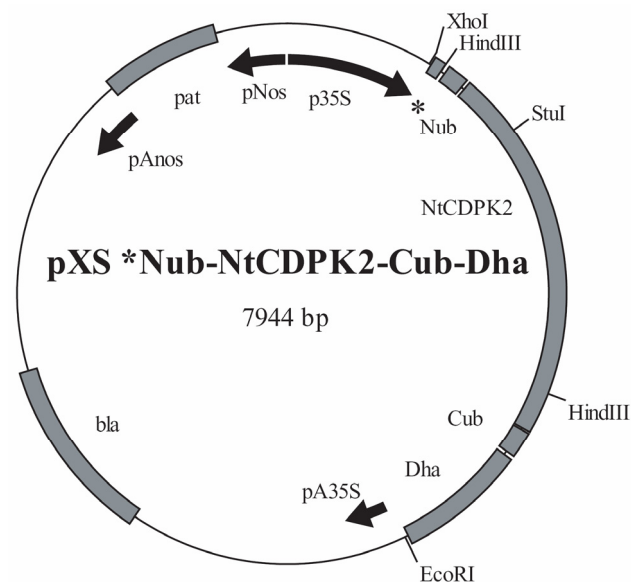
(in Kooperation mit Prof. Dr. A. Batschauer,
Philipps-Universität Marburg)

Da eine HindIII-Schnittstelle bereits im NtCDPK2-Gen vorhanden war, wurden die ORFs der entsprechenden SplitUB-Konstrukte aus den Hefe-Vektoren pCup-Nub-NtCDPK2(wt bzw. mut)-Cub-Dha mit den Primern TR 194 und TR 356 amplifiziert, und über die EcoRI Restriktions-Schnittstellen isoliert. Es folgte die Klonierung dieser 2650 bp-Fragmente in den ebenso mit EcoRI geöffneten Vektor pAMPAT-MCS (pXS Nub-NtCDPK2-Cub-Dha). Die korrekte Orientierung wurde mittels Sequenzierung bestätigt.



Zur Lokalisierung der Fusions-Konstrukte in einem Membran-Kompartiment wurde eine 5'-Teilsequenz des NtCDPK2-Gens vor den ORF des zuvor beschriebenen Plasmids kloniert. Hierzu wurden die ersten 60 Basenpaare mit den Primern TR 395 und TR 396 aus dem Vektor pXCS-HAStrep NtCDPK2mut amplifiziert und über XhoI und HindIII isoliert. Das Fragment wurde anschließend in das ebenso geöffnete Plasmid pXS Nub-NtCDPK2(VKJ)-Cub-Dha kloniert. Aus dem daraus entstandenen Vektor pXS *Nub-NtCDPK2(VKJ)-Cub-Dha wurde ein 496 bp-Fragment mittels XhoI und StuI isoliert und in das ebenso geöffnete Plasmid pXS Nub-NtCDPK2-Cub-Dha ligiert (pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha).

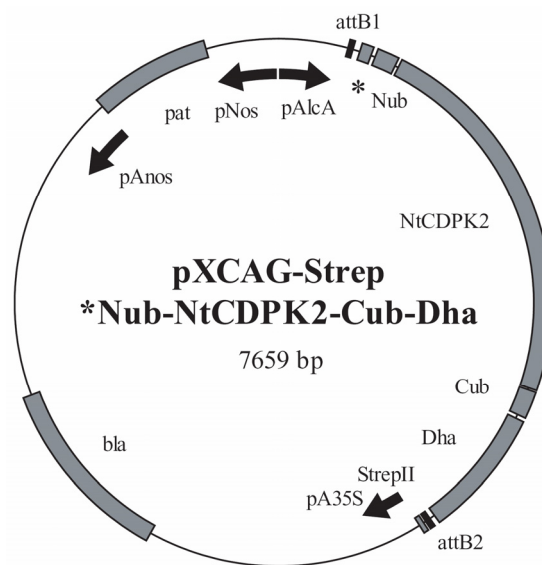
Die in J mutierte Version des zuvor genannten Plasmids wurde wiederum mittels Mutagenese-PCR mit den Primern TR 247 und TR 248 generiert.



Des Weiteren wurde die Mutation D241A in der Kinase-Domäne mit den Restriktions-Enzymen StuI und NcoI aus dem Plasmid pXCS-HAStrep NtCDPK2(D241A) isoliert (722 bp) und in den ebenso geöffneten pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha in wt- und Jmut-Form ligiert. Darüber hinaus wurden die Mutationen der Phosphorylierungs-Stellen aus den Vektoren pXCSG-Strep NtCDPK2(AA bzw. DD) (C.-P. Witte, T. Romeis, unveröffentlicht) durch Klonierung übernommen.

Die Mutation der EF-Hände #3 (E514Q) und #4 (E548Q) wurde mit einer stufenweisen PCR-Strategie eingeführt. Hierzu konnte zunächst ein 134 bp-Fragment mit den Mutagenese-Primern TR 647 und TR 648 mit Pfu-Polymerase aus dem zuvor genannten Vektor amplifiziert werden. Anschließend wurde dieses Fragment aufgereinigt und konzentriert als Primer in einer Mutagenese-PCR eingesetzt.

Um die NtCDPK2-Fusionen in Pflanze induziert exprimieren zu können, wurden die ORFs der vorangegangenen Konstrukte pXS *Nub-NtCDPK2-Cub-Dha in wt- und Jmut-Form mit den Primern TR 445 und TR 446 amplifiziert. Das 2703bp-Amplifikat wurde in pENTR\D-TOPO[®] kloniert und über eine anschließende Gateway[™]-Reaktion in den „Destination“-Vektor pXCAG-Strep hinter den Promotor pAlcA eingebracht. Auf gleiche Weise wurde der ORF NtCDPK2-Cub-Dha ohne die 5'-Sequenzen *Nub mit den Primern TR 434 und TR 446 amplifiziert und Gateway[™]-kloniert. Die resultierenden Gateway[™]-„attachment sites“ (attB1, attB2) sind in folgender Plasmid-Karte angeführt.



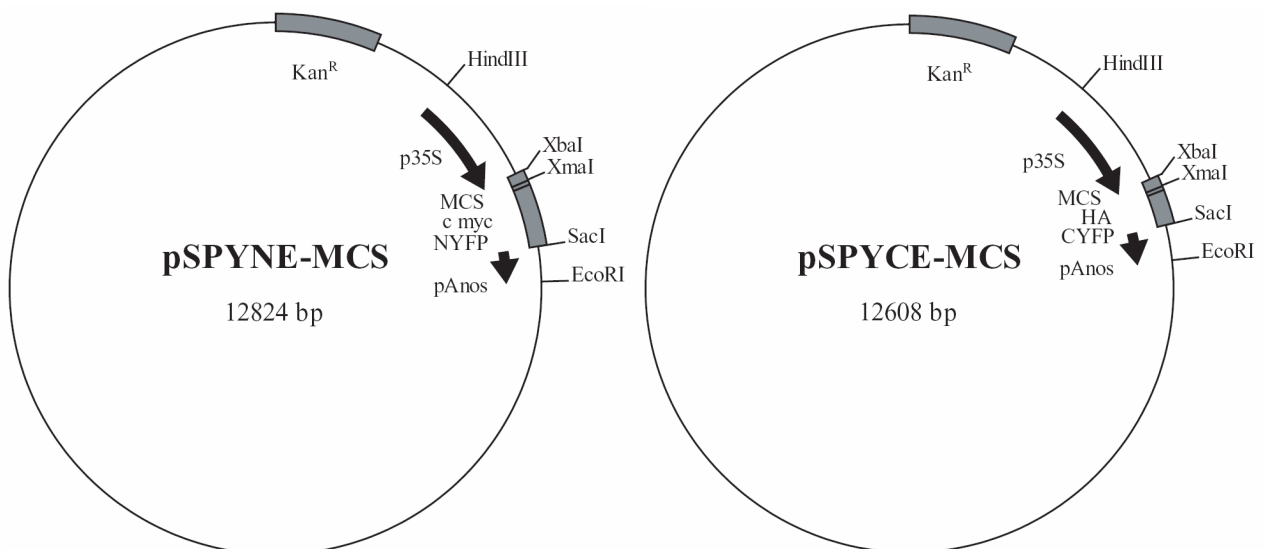
6.4.5 BiFC-Konstrukte

Die Vektoren pSPYNE und pSPYCE wurden für die Klonierung von BiFC-Konstrukten durch Prof. Dr. K. Harter (Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen) zu Verfügung gestellt, ebenso wie beide Kontroll-Plasmide mit dem bZIP-Transkriptions-Faktor AtCPRF2 (Walter *et al.*, 2004). Die Variable und Kinase-Domäne (VK) von NtCDPK2 wurden inklusive des HA-Epitoptags aus dem unter 6.4.1 beschriebenen Vektor mittels BamHI und EcoRV isoliert und in die mit BamHI und SmaI geöffneten BiFC-Plasmide kloniert. Dabei konnten die durch EcoRV und SmaI generierten „blunt“-Enden miteinander ligiert werden.

Zur Klonierung der CLD wurde diese mit den Primern TR 307 und TR 195 aus dem unter 6.4.1 beschriebenen Vektor amplifiziert und nach Klonierung in pGEM[®]-T Easy mit den Restriktions-Endonukleasen BamHI und EcoRV isoliert. Die Ligation erfolgte nach der bereits für VK beschriebenen Methode inklusive des HA-Tags.

Die Junction-Domäne von NtCDPK2 in Wildtyp- und mutierter Version wurde über die Primer TR 305 und TR 306 amplifiziert und nach Zwischen-Klonierung in pGEM[®]-T mit den Enzymen SmaI und Sall isoliert. Bei der Ligation mit den durch HpaI und XhoI geöffneten BiFC-Vektoren konnten die „blunt“-Enden von SmaI und HpaI sowie die kompatiblen Enden von Sall und XhoI fusioniert werden.

Die beiden Versionen von NtCDPK2(VKJ) wurden aus den Plasmiden pSLJ13801 (Romeis *et al.* 2001) für den Wildtyp und pCup-Nub-NtCDPK2(VKJmut)-Cub-Dha für die mutierte Form über die Primer TR 306 und TR 098 amplifiziert, mit BamHI und Sall isoliert und in die mit BamHI und XhoI geöffneten BiFC-Plasmide kloniert.



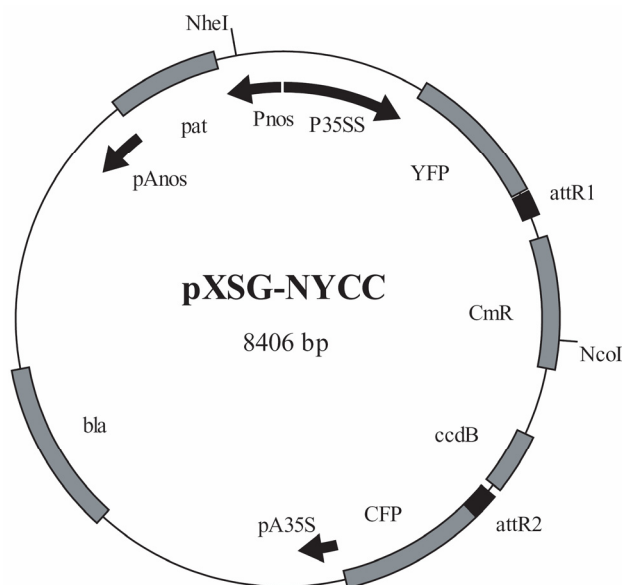
in MCS kloniert:

AtCPRF2 (Walter *et al.*, 2004); NtCDPK2(VK)-HA; NtCDPK2(CLD)-HA;
NtCDPK2(J); NtCDPK2(Jmut); NtCDPK2(VKJ); NtCDPK2(VKJmut)

6.4.6 FRET-Konstrukte

Für die Konformations-Untersuchungen von Proteinen mittels FRET wurde das GatewayTM-kompatible Plasmid pXSG-NYCC konstruiert. Ein YFP-enthaltendes Fragment (2,4 kb) wurde mittels NheI und NcoI aus dem „Destination“-Vektor pXNSG-YFP (N. Medina-Escobar, J. E. Parker, unveröffentlicht) isoliert und mit dem auf gleiche Weise aus pXCSG-CFP (Wiermer *et al.*, 2005) gewonnenen 6,0 kb-Fragment mit CFP als C-terminaler Fusion ligiert.

Mit den folgenden Primer-Kombinationen wurden NtCDPK2 bzw. die Hefe-Gene aus den Plasmiden pCup-Nub-X-Cub-Dha (X = NtCDPK2 wt oder mut, bzw. GUK1 oder FPR1) amplifiziert und anschließend in pENTR/D-TOPO[®] kloniert: TR 434 und TR 054 (NtCDPK2, wt oder mut), TR 434 und TR 522 (VKJ oder VKJmut), TR 523 und TR 054 (JCLD oder JmutCLD), TR 657 und TR 658 (GUK1), TR 659 und TR 660 (FPR1). Über die LR-Reaktion wurde dann die GatewayTM-Kassette (attR1-CmR-ccdB-attR2) durch die unterschiedlichen Versionen von NtCDPK2, GUK1 oder FPR1 aus den entsprechenden „ENTRY“-Vektoren ersetzt.



GatewayTM-klonierte Gene:

NtCDPK2
 NtCDPK2mut
 NtCDPK2(VKJ)
 NtCDPK2(VKJmut)
 NtCDPK2(JCLD)
 NtCDPK2(JmutCLD)
 GUK1
 FPR1

6.5 Transformationen von Mikroorganismen

6.5.1 Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemo-kompetenter *E. coli* wurden 5 ml einer ÜNK auf 200 ml CR-Medium überimpft und in einem Erlenmeyer-Kolben bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10 min, 2.000g, 4°C). Das Zellsediment wurde mit 60 ml Transformations-Puffer I gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 8 ml Transformations-Puffer II aufgenommen und in Reaktionsgefäßen auf 100 µl aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.5.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA und DNA aus Ligations-Ansätzen in *E. coli* wurden 50 µl elektro-kompetente *E. coli* mit maximal 5 µl DNA-Lösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern konnte. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einem Wasserbad bei 42°C für 30 s inkubiert. Die Zellen wurden kurz auf Eis gekühlt und in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5.000 g, 3 min, Raumtemperatur) und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Das Zellpellet wurde resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum, falls nötig auch mit 20 µg/ml X-Gal und 20 µg/ml IPTG, ausplattiert.

6.5.3 Herstellung elektro-kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zwei 5 ml ÜNKs in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden auf 200 ml LB ohne Antibiotikum überimpft. Die Kulturen wurden bei 28°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von maximal 0,6 inkubiert, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und bei 3500 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 ml und anschließend in 100 ml H₂O (4°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 16 ml 10%-igem Glycerin (4°C) gewaschen und wiederum in 16 ml 10%-igem Glycerin (4°C) resuspendiert. Aliquots von 40 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.5.4 Elektro-Transformation von *A. tumefaciens*

Zur Transformation von Agrobakterien wurden 40 µl elektro-kompetente Zellen aufgetaut, mit 0,5 - 1 µl Plasmid-DNA (100-250 ng/µl) gemischt und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporations-Küvette gegeben und im Elektroporator (Fa. Biorad) bei 2.5 kV, 400 Ω, 25 µF mit 125 µF Erweiterung elektroporiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der angegebene Wert für τ bei 9,3 - 9,5 µs lag. Es wurde sofort 1 ml eiskaltes YEB-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß für 1 h bei 28°C und 500 rpm im Eppendorf-Schüttler geschüttelt. Maximal 20 µl wurden auf YEB-Agar mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2-4 Tage bei 28°C inkubiert.

6.5.5 Hefe-Transformation

Eine ÜNK des Hefe-Stamms JD53 wurde auf 50 ml YPD zu einer OD₆₀₀ von 0,2 (entspricht 5×10^6 Zellen/ml) angeimpft. Nach Inkubation bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Zellen abzentrifugiert (4°C, 5 min, 2.000 g) und das Pellet in 25 ml H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml 100 mM Lithium-Acetat Lösung aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 15 s bei 16.000 g wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 0,5 ml 100 mM Lithium-Acetat Lösung resuspendiert. Zu Aliquots von je 50 µl Zellen wurden dann nacheinander 10 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 250 ng des zu transformierenden Plasmids und 6 µl DMSO zugegeben und gemischt. Beim Vortexen wurden 300 µl PEG-Lösung zugemischt. Anschließend wurden die Zellen zunächst für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert, dann wurde das Bad auf 42°C erhitzt und die Zellen weitere 30 min inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz konnte eine weitere Stunde bei 30°C inkubiert werden. Schließlich wurden die Zellen für 15 s bei 16.000 g abzentrifugiert, in 1 ml H₂O aufgenommen und auf Drop-Out- oder Minimal-Medium-Agar ausplattiert. Nach 3-6 Tagen waren Kolonien transformierter Zellen sichtbar.

6.7 Pflanzenarbeiten

6.7.1 Anzuchtbedingungen für *Nicotiana*-Arten

Tabakpflanzen der Art *N. benthamiana* wurden in Vermehrungssubstrat Typ VM (Einheitserde[®]), bestehend aus Weißtorf, Ton und Perlite (ph 6,0; NaCl 1,3 g/l; N 110 mg/l; P₂O₅ 130 mg/l; K₂O 160 mg/l) unter einer zusätzlichen Gabe von 150 g/m³ Mikronährstoffen Radigen[®] (Fa. Terraflor) kultiviert. Ausgelegte Samen wurden für drei Tage bei 4°C vernalisiert. Nach sieben Tagen Keimzeit wurden die Keimlinge pikiert und für die Versuche

im Gewächshaus kultiviert (16 h Tageslicht, bei Bedarf Beleuchtung mit ca. 100 μ E aus Natrium-Lampen, Tagestemperatur 20°C, Nachttemperatur 18°C, 50% Luftfeuchtigkeit). *N. tabacum* wurde unter annähernd gleichen Bedingungen, jedoch bei ca. 30% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für Versuche zur Verdeutlichung des Zelltods wurden die *N. benthamiana*-Pflanzen in eine Klimakammer bei 16 h Licht aus Neonröhren (ca. 500 μ E), 26°C und 50% Luftfeuchtigkeit gestellt.

6.7.2 Transiente Expression in Pflanzen

ÜNKs von *A. tumefaciens*, in die das jeweilige Expressionskonstrukt transformiert wurde, wurden abzentrifugiert (4.300 g, 15 min, Raumtemperatur) und das Pellet in Acetosyringon-Medium resuspendiert. Nach der Einstellung der OD₆₀₀ auf 0,5 - 1,0 wurden die Zellen für 2-5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Falls nötig wurden verschiedene Agrobakterien-Kulturen zur Koinfiltration gemischt. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze ohne Kanüle wurden die Bakterien durch die Spaltöffnungen der Blattunterseite und falls nötig durch einen Rasierklingen-Schnitt in den apoplastischen Raum von *N. benthamiana*- bzw. *N. tabacum*-Blättern ca. vier Wochen alter Pflanzen infiltriert. Nach 3-5 Tagen konnten Blattproben zur weiteren Analyse entnommen werden.

Zur induzierten Expression von Konstrukten in dem Vektor pXCAG wurde der Transkriptions-Faktor AlcR aus dem Plasmid pBIN19-alcR koexprimiert. Durch Inkubation der Pflanzen mit 500 ml 0,1% Ethanol in einem Mini-Gewächshaus, welches eine geschlossene Atmosphäre zuließ, konnte die Expression innerhalb weniger Stunden induziert werden.

6.7.3 Trypanblau-Färbung

Um den Zelltod in *N. benthamiana*-Blättern zu detektieren wurden Blattproben in wenige Milliliter Trypanblau-Färbelösung gegeben, so dass die Proben bedeckt waren. Bei zehnerminütigem Kochen im Wasserbad konnte das Trypanblau in tote Zellen eindringen, lebende Zellen wurden nicht gefärbt. Durch mehrmalige Entfärbung innerhalb von 4-24 h mit Chloralhydrat-Lösung konnten Unterschiede zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen verdeutlicht werden. Zur Dokumentation wurden die Blattproben mit 50% Glycerin gewaschen, in Klarsichtfolie eingeschlagen und eingescannt.

Mit Hilfe des Programms Adobe[®] Photoshop[®] (Version 6.0, Fa. Adobe Systems Incorporated) konnten gescannte Proben markiert und über die Befehle „Histogramm“ - „Luminanz“ die Helligkeit und somit die Blau-Färbung quantifiziert werden.

6.7.4 UV-Mikroskopie zum Zelltod-Nachweis

Um Zelltod-Symptome bei *N. benthamiana* detektieren zu können, wurden exprimierende Blätter unter dem Stereo-Mikroskop (Modell MZFL III, Fa. Leica, Jena) unter UV-Licht (Quecksilberdampf-Lampe, Breitbandfilter: Anregung 480-500 nm, Emission 505-550 nm) untersucht. Dabei war eine Chlorophyll-Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich zu detektieren. Tote Zellen waren durch die Akkumulation phenolischer Verbindungen grün fluoreszierend. Mit dem Rechner-gestützten Bilderfassungs-System „Diskus - Leica Makro Fluoreszenz“ (Version 4.30.418, Technisches Büro Hilgers, Königswinter) konnten digitale Bilder aufgenommen werden. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Aufnahmen nachträglich mit Adobe® Photoshop® (Version 6.0, Fa. Adobe Systems Incorporated) im Kontrast verstärkt.

6.7.5 Fluoreszenz-Mikroskopie für BiFC

Die Detektion der YFP-Fluoreszenz in *N. benthamiana* nach Expression von BiFC-Konstrukten erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Modell Axiophot, Fa. Carl Zeiss, Jena) und zugehörigen YFP-Filtern (Anregungs-Filter 480-520 nm, „beam splitter“ 515 nm, Emissions-Filter 505-565 nm). Wiederum konnten mit dem Rechner-gestützten Bilderfassungs-System „Diskus - Zeiss Fluoreszenz“ (Version 4.30.418, Technisches Büro Hilgers, Königswinter) digitale Bilder aufgenommen werden.

6.7.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Zum Nachweis von FRET wurden Blattproben von *N. benthamiana* in 25% Glycerin gebettet und unter dem inversen Laserscanning-Mikroskop LSM 510 (Software Version 3.2 Sp2, Fa. Zeiss, Jena), ausgerüstet mit Argon-Ionen- (458 und 514 nm) und Helium-Neon-Lasern (543 und 633 nm), untersucht. Entsprechend bereits publizierter Methoden (Bhat *et al.*, 2005) wurde die YFP-Fluoreszenz bei 514 nm angeregt und zwischen 527 und 570 nm detektiert. Für CFP lag die Anregung bei 458 nm, die Detektion erfolgte zwischen 480 und 520 nm. Für ein Akzeptor-„Photobleaching“ wurde eine ausgewählte Region 80-mal mit dem Argon-Laser (514 nm) bei 100% Intensität gebleicht.

Zur Berechnung und graphischen Darstellung der FRET-Effizienzen wurde das Computer-Programm „LSM FRET Tool“ (Version 1.5 for Carl Zeiss AIM Software Release 3.2 add-on) verwendet, dem die in Abbildung 16 C gezeigte Formel zugrunde liegt.

6.8 Proteinarbeiten

6.8.1 Protein-Extrakte aus *N. benthamiana*

Blattproben von 30-40 mg und ca. 15 mm Durchmesser wurden mit einem Korkbohrer aus *N. benthamiana*-Blättern gestochen und schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese wurden zusammen mit einer Stahlkugel von 4 mm Durchmesser in 2 ml Reaktionsgefäßen in einer partiell Stickstoff-gekühlten Zelmühle (Modell MM300, Fa. Retsch, Haan) für 1 min bei 30 Hz geschüttelt und dabei zu feinem Pulver gemahlen. Anschließend wurden die Zellbruchstücke in 100-200 µl Protein-Extraktionspuffer aufgenommen und auf Eis aufgetaut. Nach vollständigem Auftauen der Proben, evtl. nach Inkubation für 30 min bei 4°C im „test tube rotator“ (Modell 34528, Fa. Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande) zum Lösen von Membran-gebundenen Proteinen durch Triton[®]X-100, wurden Zellbruchtrümmer und unlösliche Bestandteile bei 16.000 g und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde abgenommen, für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert. Zum Auftrag der Proben auf eine SDS-PAGE wurden diese mit Proteingel-Auftragspuffer (3x) versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und kurz abzentrifugiert.

6.8.2 Protein-Extrakte aus Hefe

Eine größere Hefe-Kolonie wurde in 200 µl H₂O resuspendiert. Alternativ konnte 1 ml ÜNK mit einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 abzentrifugiert (16.000g, 15 sec) und das Pellet in 200 µl H₂O resuspendiert werden. Nach Zugabe von 30 µl eines Gemisches aus 1,85 M NaOH und 7,5% β-Mercaptoethanol (jeweils f.c.) wurde die Suspension gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Es wurden anschließend 30 µl 55% Trichloracetat (TCA, w/v) hinzugemischt und erneut für 10 min bei 4°C inkubiert. Die durch diese Prozedur aufgeschlossenen Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 20.000g, 4°C), wobei die Proteine durch das Trichloracetat gefällt werden konnten. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 20 µl HU-Puffer resuspendiert und bei Gelbfärbung des Indikators mit maximal 5 µl 1M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 versetzt. Die Probe wurde für 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf ein SDS-Gel geladen.

6.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen erfolgte über eine SDS-PAGE, bei der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts gelelektrophoretisch aufgetrennt werden (nach Laemmli, 1970). Um eine optimale Auftrennung der Proteine mit Molekulargewichten zwischen 36 und 94 kDa zu

erreichen (Sambrook *et al.*, 1989), sind die Spezifikationen von Sammel- und Trenngel wie folgt gewählt worden:

Sammelgel:

4,5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid
125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS

Trenngel:

10,5-12% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid
375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1% (w/v) SDS

Polymerisationsstart jeweils durch Zugabe von:

0,1% (w/v) APS, gelöst in H₂O
0,1% (v/v) TEMED

Zunächst wurden 4 ml Trenngel zwischen die mit Abstandshaltern versehenen Glasplatten der Gelapparatur (Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, Fa. Biorad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Alkohol abgeschüttet und mit Blotting-Papier restlos entfernt. 1 ml Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und ein Gelkamm mit 10 oder 15 Spuren gesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die vertikale Gelapparatur eingespannt. Die Puffertanks wurden anschließend mit Proteingel-Laufpuffer gefüllt.

Anschließend wurde ein Proben-Volumen von bis zu 15 µl (bei einem 15er Kamm) oder 25 µl (bei einem 10er Kamm) pro Spur aufgetragen. Die Proben wurden bei 80 V bis zum Erreichen des Trenngels und dann bei 120-160 V aufgetrennt, bis die Lauffront oder die gewünschte Marker-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach Abnehmen einer Glasplatte wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für eine Western-Blot-Analyse auf eine Membran transferiert.

6.8.5 Western-Blot und Quantifizierung

Die Detektion von Proteinen mittels Antikörper erfolgte mit der Methode des Western-Blots. Dabei wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus Zellextrakten elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. In dem Mini-PROTEAN[®] System (Fa. Biorad) wurden die folgenden in ausreichend Blotting-Puffer getränkten Komponenten vom Minus-Pol zum Plus-Pol der Stromquelle hin aufgebaut: Ein Schwammtuch, ein Blotting-Papier, das SDS-Gel, eine Nitrocellulose-Membran, ein weiteres Blotting-Papier und ein Schwammtuch. Anschließend wurden mögliche Luftblasen zwischen den Lagen durch Überrollen mit einem Reagenzglas entfernt. Die Übertragung der durch das SDS weiterhin negativ geladenen Proteine auf die Membran erfolgte für 1-2 h bei 100 V oder über Nacht bei 40 V in einer mit Blotting-Puffer gefüllten Transfer-Kammer

(Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, Fa. Biorad). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Puffer-Temperatur nicht deutlich über Raumtemperatur stieg (Eisbehälter, Magnetrührer, evtl. Kühlraum). Die Membran konnte anschließend entnommen und mit Ponceau S-Lösung eingefärbt werden. Nach 1-2 Minuten Inkubation wurde die Lösung abgeschüttet und die Membran mit H₂O gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Membran konnte nun eingescannt werden, um die gleichmäßige Beladung der Spuren zu bestätigen.

Durch anschließende Inkubation für mindestens 15 min in 5% (w/v) Milchpulver in TBST wurden die freien Stellen der Nitrocellulose-Membran geblockt, so dass keine weiteren Proteine mehr binden konnten. Nach dem vollständigen Entfernen des Milchpuffers wurden 10 ml TBST mit primärem Antikörper [anti-HA (1:4.000), anti-c myc (1:4.000), anti-GFP (1:5.000)] zugegeben und die Membran für 2-3 h bei Raumtemperatur bzw. 16 h bei 4°C unter leichtem Schwenken von 40 rpm inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 20 ml TBST wurden 10 ml TBST mit sekundärem Antikörper [anti-mouse (1:4.000), anti-rat (1:4.000)] zugegeben und für weitere 1-2 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST konnten nach Zugabe von AP-Puffer die detektierten Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Dies ist durch die Kopplung von Alkalischer Phosphatase (AP) an den sekundären Antikörper möglich. Bei der AP-Reaktion wird BCIP dephosphoryliert und dimerisiert nach Oxidation zu einem unlöslichen, violetten Niederschlag, wobei NBT zu NBT-Formazan reduziert wird.

Zur Detektion von Proteinen mit StrepII-Tag wurde die Membran nach der Inkubation in 5% (w/v) Milchpulver in TBST mit 2 µl Avidin (10 mg/ml) in 10 ml TBST für 10 min geschwenkt. Danach wurden 2 µl *Strep-Tactin*[®] AP-Konjugat zugegeben und die Membran für 1-2 h weiter unter leichtem Schwenken von 40 rpm inkubiert. Die anschließende AP-Reaktion erfolgte wie zuvor beschrieben.

Über das Computer-Programm Image Quant (Version 5.2, Fa. Molecular Dynamics) wurden die auf einem Western-Blot befindlichen Banden mit Rechtecken identischer Größe ausgewählt, die jeweils die gesamte Fläche einer Bande jedoch nicht die benachbarten umfassten. Bei der Quantifizierung wurde die Option „*Local Average*“ gewählt, durch die von den Intensitäten der lokale Hintergrund subtrahiert wird. Mit dem Computer-Programm Excel (Version 2003, Fa. Microsoft) konnten anschließend die Spaltungs-Raten der SplitUB-Konstrukte als Verhältnis von Reporter-Bande zu [Gesamtkonstrukt-Bande + Reporter-Bande] bestimmt werden. Die Berechnung der Standard-Fehler und die graphische Darstellung erfolgten über das Computer-Programm Prism 4 (Version 4.01, Fa. GraphPad Software).

6.9 Erstellung eines phylogenetischen Baums

Zur graphischen Darstellung von Verwandtschafts-Verhältnissen von CDPKs wurde ein phylogenetischer Baum erstellt (s. Abb. 4). Mithilfe der Programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) und BioEdit (Version 7.0.1; Hall, 1999) konnten zunächst die Aminosäuren-Sequenzen der CDPKs aus *A. thaliana* und *N. benthamiana* verglichen werden. Aus diesen Daten wurde mit den „PHYLIP“-Programmen (Phylogeny Inference Package, Copyright 1986-1993, Joseph Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA) PROTDIST, NEIGHBOR und DRAWTREE ein phylogenetischer Baum erstellt. Nachträglich wurden dann mit den Programmen SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOR und CONSENSE, DRAWTREE die „*Bootstrap*“-Werte von 100 Replikaten errechnet und in den ersten Baum eingefügt.

7 Literatur

- Ahmad M, Cashmore AR** (1993) Hy4 Gene of *A. thaliana* Encodes a Protein with Characteristics of a Blue-Light Photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166
- Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR** (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro. *Molecular Cell* **1**: 939-948
- Allwood EG, Smertenko AP, Hussey PJ** (2001) Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *Febs Letters* **499**: 97-100
- Aoyama T, Chua NH** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Journal* **11**: 605-612
- Asano T, Tanaka N, Yang GX, Hayashi N, 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 and Cell Physiology* **46**: 356-366
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A** (1986) *In vivo* Half-Life of a Protein Is a Function of Its Amino-Terminal Residue. *Science* **234**: 179-186
- Bhat RA, Borst JW, Riehl M, Thompson RD** (2004) Interaction of maize Opaque-2 and the transcriptional co-activators GCN5 and ADA2, in the modulation of transcriptional activity. *Plant Molecular Biology* **55**: 239-252
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R** (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3135-3140
- Bairoch A, Bucher P** (1994) Prosite - Recent Developments. *Nucleic Acids Research* **22**: 3583-3589
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V** (2004) Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**: 503-514
- Boeke JD, Lacroute F, Fink GR** (1984) A Positive Selection for Mutants Lacking Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase Activity in Yeast - 5-Fluoro-Orotic Acid Resistance. *Molecular & General Genetics* **197**: 345-346
- Bouly JP, Giovani B, Djamei A, Mueller M, Zeugner A, Dudkin EA, Batschauer A, Ahmad M** (2003) Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with Arabidopsis and human cryptochrome-1. *European Journal of Biochemistry* **270**: 2921-2928
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S, Ohad N** (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* **40**: 419-427
- Breviario D, Morello L, Giani S** (1995) Molecular-Cloning of 2 Novel Rice cDNA Sequences Encoding Putative Calcium-Dependent Protein-Kinases. *Plant Molecular Biology* **27**: 953-967
- Broder YC, Katz S, Aronheim A** (1998) The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Current Biology* **8**: 1121-1124

- Chen M, Chory J, Fankhauser C** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* **38**: 87-117
- Chico JM, Raices M, Tellez-Inon MT, Ulloa RM** (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiology* **128**: 256-270
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S** (1991) The 2-Hybrid System - a Method to Identify and Clone Genes for Proteins That Interact with a Protein of Interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 9578-9582
- Chou JJ, Li SP, Klee CB, Bax A** (2001) Solution structure of Ca²⁺-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nature Structural Biology* **8**: 990-997
- Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF, Chazin WJ** (2004) Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 29092-29100
- Crivici A, Ikura M** (1995) Molecular and Structural Basis of Target Recognition by Calmodulin. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **24**: 85-116
- Damjanovich S, Vereb G, Schaper A, Jenei A, Matko J, Starink JPP, Fox GQ, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM** (1995) Structural Hierarchy in the Clustering of HLA Class I Molecules in the Plasma Membrane of Human Lymphoblastoid Cells. *PNAS* **92**: 1122-1126
- Dohmen RJ, Stappen R, Mcgrath JP, Forrova H, Kolarov J, Goffeau A, Varshavsky A** (1995) An Essential Yeast Gene Encoding a Homolog of Ubiquitin-Activating Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 18099-18109
- Ehrhard KN, Jacoby JJ, Fu XY, Jahn R, Dohlman HG** (2000) Use of G-protein fusions to monitor integral membrane protein-protein interactions in yeast. *Nature Biotechnology* **18**: 1075-1079
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M** (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**: 669-679
- Fields S, Song OK** (1989) A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Förster T** (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* **2**: 55-75
- Freymark G, Diehl T, Miklis M, Romeis T, Panstruga R** (in Vorbereitung) Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs)
- Fukaya T, Mori H** (2003) Analysis of protein kinase involved in phosphorylation of tomato ACC synthase, LE-ACS2. *Plant and Cell Physiology* **44**: S153-S153
- Gabor G** (1968) Radiationless Energy Transfer through a Polypeptide Chain. *Biopolymers* **6**: 809-&
- Gadella TW, Jr., Jovin TM** (1995) Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J. Cell Biol.* **129**: 1543-1558
- Glinski M, Romeis T, Witte CP, Wienkoop S, Weckwerth W** (2003) Stable isotope labeling of phosphopeptides for multiparallel kinase target analysis and identification of phosphorylation sites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**: 1579-1584

- Gonda DK, Bachmair A, Wunning I, Tobias JW, Lane WS, Varshavsky A** (1989) Universality and Structure of the N-End Rule. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 16700-16712
- Grand RJA** (1989) Acylation of Viral and Eukaryotic Proteins. *Biochemical Journal* **258**: 625-638
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D** (1990) Differential Plasmid Rescue from Transgenic Mouse Dnas into *Escherichia coli* Methylation-Restriction Mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4645-4649
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98
- Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG** (1994) Developmentally Regulated Cell Death on Expression of the Fungal Avirulence Gene Avr9 in Tomato Seedlings Carrying the Disease-Resistance Gene Cf-9. *PNAS* **91**: 10445-10449
- Han SC, Tang RH, Anderson LK, Woerner TE, Pei ZM** (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ sensing in guard cells. *Nature* **425**: 196-200
- Hanks SK, Hunter T** (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**: 576-596
- Hara-Nishimura I, Matsushima R** (2003) A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses? *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 583-588
- Hardie DG** (1999) Plant Protein Serine/Threonine Kinases: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 97-131
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF** (2000) CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* **5**: 154-159
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C** (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**: 7278-7287
- Harper JF, Breton G, Harmon A** (2004) Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 263-288
- Harper JF, Harmon A** (2005) Plants, symbiosis and parasites: A calcium signalling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 555-566
- Harper JF, Huang JF, Lloyd SJ** (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**: 7267-7277
- Harper JF, Sussman MR, Schaller GE, Putnamevans C, Charbonneau H, Harmon AC** (1991) A Calcium-Dependent Protein-Kinase with a Regulatory Domain Similar to Calmodulin. *Science* **252**: 951-954
- Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR, Bunner AE, Harper JF** (2004) An isotope labeling strategy for quantifying the degree of phosphorylation at multiple sites in proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **15**: 647-653
- Hink MA, Bisseling T, Visser AJWG** (2002) Imaging protein-protein interactions in living cells. *Plant Molecular Biology* **50**: 871-883

- Hoffman PD, Batschauer A, Hays JB** (1996) PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Molecular & General Genetics* **253**: 259-265
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**: 789-798
- Hua W, Li RJ, Wang L, Lu YT** (2004) A tobacco calmodulin-binding protein kinase (NtCBK2) induced by high-salt/GA treatment and its expression during floral development and embryogenesis. *Plant Science* **166**: 1253-1259
- Huang JF, Teyton L, Harper JF** (1996) Activation of a Ca²⁺-dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. *Biochemistry* **35**: 13222-13230
- Huang JZ, Hardin SC, Huber SC** (2001) Identification of a novel phosphorylation motif for CDPKs: Phosphorylation of synthetic peptides lacking basic residues at P-3/P-4. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **393**: 61-66
- Huang JZ, Huber SC** (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 and Cell Physiology* **42**: 1079-1087
- Innis MA, Gelfand DH** (1990) Optimization of PCRs. *In* MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp 3-20
- Johnsson N** (2002) A split-ubiquitin-based assay detects the influence of mutations on the conformational stability of the p53 DNA binding domain *in vivo*. *FEBS Lett* **531**: 259-264
- Johnsson N, Varshavsky A** (1994) Split Ubiquitin as a Sensor of Protein Interactions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10340-10344
- Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Muller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho MJ, Schulze-Lefert P** (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* **416**: 447-450
- Kleine T, Lockhart P, Batschauer A** (2003) An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal* **35**: 93-103
- Kolukisaoglu U, Weini S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J** (2004) Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases: Genomics of the Arabidopsis and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. *Plant Physiol.* **134**: 43-58
- Koncz C, Schell J** (1986) The Promoter of Tl-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. *Molecular & General Genetics* **204**: 383-396
- Koornneef M, Rolff E, Spruit CJP** (1980) Genetic-Control of Light-Inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **100**: 147-160
- Kretsing R, Nockolds CE** (1973) Carp Muscle Calcium-Binding Protein. 2. Structure Determination and General Description. *Journal of Biological Chemistry* **248**: 3313-3326

- Kroeker M** (1994) Entwicklung und Erprobung des PIMM91-Kraftfeldes zur Modellierung von Molekülstrukturen. Dissertation. TH Darmstadt
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4718-4723
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lin C, Shalitin D** (2003) Cryptochrome Structure and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 469-496
- Loog M, Toomik R, Sak K, Muszynska G, Jarv J, Ek P** (2000) Peptide phosphorylation by calcium-dependent protein kinase from maize seedlings. *European Journal of Biochemistry* **267**: 337-343
- Lu SX, Hrabak EM** (2002) An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **128**: 1008-1021
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG** (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany* **55**: 181-188
- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones DG, Romeis T** (2005) Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, no. **30**: 10736–10741
- Ma L, Liang SP, Jones RL, Lu YT** (2004) Characterization of a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase from tobacco. *Plant Physiology* **135**: 1280-1293
- Martin ML, Busconi L** (2001) A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiology* **125**: 1442-1449
- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**: 1807-1814
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY** (1997) Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**: 882-887
- Monroy AF, Dhindsa RS** (1995) Low-Temperature Signal-Transduction - Induction of Cold Acclimation-Specific Genes of Alfalfa by Calcium at 25°C. *Plant Cell* **7**: 321-331
- Mori H, Iwata M, Fukaya T, Tatsuki M** (2003) The regulatory Mechanism of the Turnover of LE-ACS2 by Phosphorylation. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona
- Müller M** (2003) Der Blaulicht-Photorezeptor Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana*: Lichtabhängige Phosphorylierung und Interaktionspartner in der Signaltransduktion. Dissertation. Philipps-Universität Marburg
- Müller M, Djamei A, Batschauer A** (2003) Lichtabhängige Phosphorylierung des Photorezeptors Cryptochrom 2. 16. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen

- Murillo I, Jaeck E, Cordero MJ, Segundo BS** (2001) Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection. *Plant Molecular Biology* **45**: 145-158
- Neff MM, Chory J** (1998) Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiology* **118**: 27-36
- Neumann GM, Thomas I, Polya GM** (1996) Identification of the site on potato carboxypeptidase inhibitor that is phosphorylated by plant calcium-dependent protein kinase. *Plant Science* **114**: 45-51
- Partch CL, Clarkson MW, Ozgur S, Lee AL, Sancar A** (2005) Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* **44**: 3795-3805
- Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux M, Hetherington AM, Sanders D** (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**: 404-408
- Poovaiah BW, Reddy AS** (1993) Calcium and signal transduction in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* **12**: 185-211
- Raquet X, Eckert JH, Muller S, Johnsson N** (2001) Detection of altered protein conformations in living cells. *J Mol Biol* **305**: 927-938
- Roberts DM, Harmon AC** (1992) Calcium-Modulated Proteins - Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher-Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 375-414
- Romeis T** (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 407-414
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG** (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo Journal* **20**: 5556-5567
- Romeis T, Piedras P, Jones JD** (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**: 803-816
- Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M, Costa R, Kyriacou CP** (2001) Light-dependent interaction between Drosophila CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology* **11**: 909-917
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K** (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant Journal* **23**: 319-327
- Saijo Y, Hata S, Sheen J, Izui K** (1997) cDNA cloning and prokaryotic expression of maize calcium-dependent protein kinases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1350**: 109-114
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes. *In* J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis, eds, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Ed 2 Vol 3. CHS Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p 18.47
- Sancar GB** (2000) Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **451**: 25-37

- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**: S401-S417
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467
- Sebastia CH, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC** (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation *in vitro* that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428**: 81-91
- Senin II, Fischer T, Komolov KE, Zinchenko DV, Philippov PP, Koch KW** (2002) Ca²⁺-myristoyl switch in the neuronal calcium sensor recoverin requires different functions of Ca²⁺-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 50365-50372
- Sessa G, Martin GB** (2000) Protein kinases in the plant defense response. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol 32: 379-404
- Shi J, Kim K-N, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, Luan S, Kudla J** (1999) Novel Protein Kinases Associated with Calcineurin B-like Calcium Sensors in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**: 2393-2406
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA** (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* **282**: 1488-1490
- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S** (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5187-5192
- Stehle T, Schulz GE** (1992) Refined Structure of the Complex between Guanylate Kinase and Its Substrate Gmp at 2-Bullet-0 Angstrom Resolution. *Journal of Molecular Biology* **224**: 1127-1141
- Stoelzle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P** (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1456-1461
- Strynadka NCJ, James MNG** (1989) Crystal Structures of the Helix-Loop-Helix Calcium-Binding Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 951-999
- Tafelmeyer P, Johnsson N, Johnsson K** (2004) Transforming a (beta/alpha)(8)-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chemistry & Biology* **11**: 681-689
- Tatsuki M, Mori H** (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 28051-28057
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680
- Todo T, Ryo H, Yamamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, Nomura T, Ikenaga M** (1996) Similarity among the Drosophila (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* **272**: 109-112

- Towler DA, Gordon JI, Adams SP, Glaser L** (1988) The Biology and Enzymology of Eukaryotic Protein Acylation. *Annual Review of Biochemistry* **57**: 69-99
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchishinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K** (1994) 2 Genes That Encode Ca²⁺-Dependent Protein-Kinases Are Induced by Drought and High-Salt Stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* **244**: 331-340
- Varshavsky A** (2005) Regulated protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 283-286
- Vitart V, Christodoulou J, Huang JF, Chazin WJ, Harper JF** (2000) Intramolecular activation of a Ca²⁺-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. *Biochemistry* **39**: 4004-4011
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**: 949-956
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* **40**: 428-438
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ** (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 599-609
- Weljie AM, Gagne SM, Vogel HJ** (2004) Solution structure and backbone dynamics of the N-terminal region of the calcium regulatory domain from soybean calcium-dependent protein kinase alpha. *Biochemistry* **43**: 15131-15140
- Weljie AM, Robertson KM, Vogel HJ** (2003) Conformational changes in the Ca²⁺-regulatory region from soybean calcium-dependent protein kinase-alpha - Fluorescence resonance energy transfer studies. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 43764-43769
- Weljie AM, Vogel HJ** (2004) Unexpected structure of the Ca²⁺-regulatory region from soybean calcium-dependent protein kinase-alpha. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 35494-35502
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 383-389
- Witte CP, Noel LD, Gielbert J, Parker JE, Romeis T** (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Molecular Biology* **55**: 135-147
- Wittke S, Lewke N, Muller S, Johnsson N** (1999) Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Molecular Biology of the Cell* **10**: 2519-2530
- Worthington EN, Kavakh IH, Berrocal-Tito G, Bondo BE, Sancar A** (2003) Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 39143-39154
- Yamagata K, Goto K, Kuo CH, Kondo H, Miki N** (1990) Visinin - a Novel Calcium-Binding Protein Expressed in Retinal Cone Cells. *Neuron* **4**: 469-476
- Yang H-Q, Wu Y-J, Tang R-H, Liu D, Liu Y, Cashmore AR** (2000) The C Termini of Arabidopsis Cryptochromes Mediate a Constitutive Light Response. *Cell* **103**: 815-827

-
- Yoo BC, Harmon AC** (1996) Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **35**: 12029-12037
- Yoon GM, Cho HS, Ha HJ, Liu JR, Lee HSP** (1999) Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Molecular Biology* **39**: 991-1001
- Yoshino H, Izumi Y, Sakai K, Takezawa H, Matsuura I, Maekawa H, Yazawa M** (1996) Solution X-ray scattering data show structural differences between yeast and vertebrate calmodulin: Implications for structure function. *Biochemistry* **35**: 2388-2393
- Young RM, Arnette JK, Roess DA, Barisas BG** (1994) Quantitation of Fluorescence Energy-Transfer between Cell-Surface Proteins Via Fluorescence Donor Photobleaching Kinetics. *Biophysical Journal* **67**: 881-888
- Zhang L, Lu YT** (2003) Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends in Plant Science* **8**: 123-127
- Zuo JR, Niu QW, Chua NH** (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal* **24**: 265-273

8 Anhang

8.1 Tabellen 9 und 10

Tab. 9: FRET-Effizienzen von NtCDPK2-Konstrukten^a.

	YFP-NtCDPK2-CFP			YFP-NtCDPK2mut-CFP		
	1. Probe	2. Probe	3. Probe	1. Probe	2. Probe	3. Probe
Bereich A	12,67 ^b	23,87	35,53	11,07	4,60	25,50
Bereich B	7,10	32,08	41,28	-1,51	9,99	24,95
Bereich C	21,28	37,27	55,99	0,72	19,58	30,28
Bereich D	20,39	31,21	38,87	16,34	20,90	26,75
Kontrolle A	-7,49	-12,19	7,47	-35,72	-2,55	-2,60
Kontrolle B	-20,87	-14,39	8,14	1,32	-2,89	-5,25
Kontrolle C	-2,05	-19,27	-10,47	-8,15	-2,46	2,68
Kontrolle D	-15,46	11,42	8,97	11,61	1,75	-1,58

a: Nach transienter Expression der FRET-Konstrukte mit NtCDPK2 und NtCDPK2mut in *N. benthamiana* wurden von je drei Regionen einer Blattscheibe (Proben 1-3) die FRET-Effizienzen bestimmt. Die YFP-gebleichten Bereiche und ungebleichten Kontrollen wurden in vier Flächen (A-D) unterteilt und einzeln ausgewertet. b: FRET-Effizienzen [%].

Tab. 10: FRET-Effizienzen von Guk1p- & Fpr1p -Konstrukten^a.

	YFP-Guk1p-CFP			YFP-Fpr1p-CFP		
	1. Probe	2. Probe	3. Probe	1. Probe	2. Probe	3. Probe
Bereich A	2,15 ^b	7,30	-4,81	1,15	5,68	19,36
Bereich B	4,98	10,97	12,20	3,10	2,85	23,62
Bereich C	6,06	6,35	12,00	5,17	0,27	20,28
Bereich D	9,54	5,82	-12,90	0,50	-0,63	21,80
Kontrolle A	-4,82	-29,96	13,78	-1,09	-1,01	10,36
Kontrolle B	8,66	-3,22	17,46	9,21	-1,64	7,88
Kontrolle C	-6,14	-11,19	1,57	-1,48	-1,91	-7,39
Kontrolle D	1,16	-1,64	-8,43	-0,39	-1,06	8,73

a: Nach transienter Expression der FRET-Konstrukte mit Guk1p und Fpr1p in *N. benthamiana* wurden von je drei Regionen einer Blattscheibe (Proben 1-3) die FRET-Effizienzen bestimmt. Die YFP-gebleichten Bereiche und ungebleichten Kontrollen wurden in vier Flächen (A-D) unterteilt und einzeln ausgewertet. b: FRET-Effizienzen [%].

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1: Protein-Kinasen aus Pflanzen	2
2: Konservierter, modularer Aufbau von CDPKs, CCaMKs und CRKs	3
3: Modell des EF-Hand-Aufbaus	4
4: Phylogenetischer Baum von CDPKs	6
5: Aktivierungs-Modell von CDPKs	7
6: Sequenzvergleich von CDPKs	9
7: Involvierung der NtCDPK2 in der Signaltransduktion	10
8: Aktivierungs-Modell für Cryptochrom	12
9: Das Ubiquitin-System von Hefe	14
10: Grundlage des SplitUB-Systems	15
11: Genetisches Selektions-Verfahren mit dem SplitUB-System	16
12: Modell des SplitUB-Systems <i>in cis</i>	17
13: Modell des „ <i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> “ (BiFC)	18
14: Fluoreszenz-Spektren von CFP und YFP	19
15: Modell des intramolekularen FRET	20
16: Modell des Akzeptor-„ <i>Photobleaching</i> “	21
17: Sequenzvergleich von Junction-Domänen sowie dem Pseudosubstrat Melittin	24
18: Sequenzvergleich von NtCDPK2(J) mit typischen Phosphorylierungs-Motiven	24
19: Vergleich NtCDPK2 und NtCDPK2mut	25
20: Phänotypen von NtCDPK2-Konstrukten in <i>N. benthamiana</i>	26
21: Wachstumstest transformierter Hefen	27
22: Expression von Nub-Konstrukten <i>in planta</i>	28
23: Koexpression von SplitUB- <i>in trans</i> -Konstrukten <i>in planta</i>	29
24: Vergleich von NtCDPK2 mit bekannten Konstrukten im SplitUB-System in Hefe	31
25: NtCDPK2(VKJ) im SplitUB-System in Hefe	32
26: Spaltungs-Raten in Abhängigkeit der Calcium-Konzentration	33
27: Hefe-Proteine im SplitUB-System <i>in planta</i>	34
28: Abhängigkeit von korrekter Lokalisierung im SplitUB-System <i>in planta</i>	35
29: Spaltungs-Raten im SplitUB-System <i>in planta</i> in Abhängigkeit von Nub	36
30: Zelltod-Symptome nach Trypanblau-Färbung in Abhängigkeit von J und K	37
31: Abhängigkeit der Spaltungs-Raten von der Kinase-Aktivität im SplitUB-System <i>in planta</i>	38
32: Einfluss von Mutationen der Phosphorylierungs-Stellen in NtCDPK2-SplitUB-Konstrukten	39
33: Sequenzvergleich von EF-Händen	40
34: Spaltungs-Raten in Abhängigkeit der Funktionalität der EF-Hände	41
35: Stimulus-abhängige Konformations-Änderungen von NtCDPK2	42
36: Konformations-Änderungen von CRY2 nach Dunkel-Stimulus	44
37: Konformations-Änderungen von CRY2 nach Licht-Stimulus	44
38: AtCPRF2-Interaktionen mit BiFC in <i>N. benthamiana</i>	46
39: NtCDPK2-Domänen-Interaktionen mit BiFC in <i>N. benthamiana</i>	47
40: Phänotypen nach transienter Expression der FRET-Konstrukte	50
41: Aufnahmen der Laserscanning-Mikroskopie	51
42: FRET-Effizienzen von NtCDPK2-Konstrukten	51
43: FRET-Effizienzen von Guk1p- und Fpr1p-Konstrukten	52
44: Modell für ein genetisches Selektions-Verfahren auf Basis des SplitUB-Systems <i>in planta</i>	71
45: Mutagenese-PCR von Plasmiden	86
46: Stufenweise PCR-Mutagenese	86

8.3 Danksagung

Frau Prof. Dr. Tina Romeis danke ich herzlich für die äußerst interessante Themenstellung, ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft und vielfältige Unterstützung, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank auch dafür, meine Promotion am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln durchführen zu können und der Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Bölker für die Betreuung, vielfältige Diskussionen und die unermüdliche Bereitschaft, mich in diesem Forschungsvorhaben voranzubringen.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Batschauer und seiner Gruppe, insbesondere Rafael und Oxana, für die Kooperation und Diskussion im Rahmen der Untersuchungen an Cryptochrom.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Prüfungs-Kommission, für das Erstellen der Gutachten.

Der ganzen Arbeitsgruppe am MPIZ in Köln, allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern, danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre. Vielen Dank an Tobias Diehl, den ich während seiner Diplomarbeit betreuen durfte, und besonders auch an Dr. Claus-Peter Witte und Maik Böhmer für den steten Austausch von Informationen.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die Finanzierung im Rahmen des SFBs 635 „Posttranslationale Funktionskontrolle von Proteinen“.

Ich danke Dr. Nils Johnsson, Prof. Dr. Klaus Harter, Dr. Ralph Panstruga, Dr. Chiara Consonni und Dr. Nieves Medina-Escobar für die Bereitstellung verschiedener Vektoren und die stete Beantwortung meiner Fragen.

Darüber hinaus gilt mein Dank der Abteilung „Pflanze-Pathogen Interaktionen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert am MPIZ in Köln und der Serviceabteilung ADIS, insbesondere auch Dr. Elmon Schmelzer und Dr. Riyaz Bhat, die mir bei der Laserscanning-Mikroskopie weitergeholfen haben.

Größter Dank gilt meinen Eltern, die mein Studium erst ermöglichten und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, und allen Freunden aus Niederweimar, insbesondere Biggi und Martin, nicht zuletzt auch für das Korrekturlesen der Arbeit.

8.4 Lebenslauf

Gerald Freymark geboren am 24. März 1977 in Mönchengladbach

Schulbildung

08/1983-07/1987 Grundschule Martins-Schule, Viersen

08/1987-06/1996 Erasmus-von-Rotterdam Gymnasium, Viersen
Abitur mit der Note 1,8

Zivildienst

09/1996-09/1997 Rheinische Schule für Körperbehinderte, Mönchengladbach

Studium

10/1997 - 02/2002 Studium der Biologie an der Philipps-Universität, Marburg
Fächer im Hauptstudium: Genetik, Pflanzenphysiologie und Photobiologie, Mikrobiologie, Zusatzfach Biochemie
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Bölker,
Titel: „Untersuchungen des *pyr4*-Gens von *Ustilago maydis*“
Diplom mit der Note 1,0

10/2000 - 02/2001 Auslands-Forschungsaufenthalt
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.D.G. Jones,
John-Innes Centre Norwich, Großbritannien,
Thema: Biochemische Analysen von NtCDPK2 und NtCDPK3

Promotion

04/2002 - 10/2005 Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Romeis,
Titel: „*In vivo*-Untersuchungen von Konformations-Änderungen
der Calcium-abhängigen Protein-Kinase NtCDPK2
aus *Nicotiana tabacum*“

Publikationen

Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones DG, Romeis T (2005)

"Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
102, no. 30: 10736-10741

Freymark G, Diehl T, Miklis M, Romeis T, Panstruga R (in Vorbereitung)

"Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs)"

Konferenzen

Poster-Präsentation bei der Jahrestagung des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln, September 2002:

„Functional analysis of the A. thaliana CDPK gene family in a transient expression system“

Poster-Präsentation bei der 16. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“ in Dabringhausen, Februar 2003:

„Funktionelle Analyse einer Proteinkinase-Genfamilie aus Arabidopsis thaliana (AtCPKs) nach transienter Expression in Nicotiana benthamiana“

Poster-Präsentation beim „7th International Congress of Plant Molecular Biology“ in Barcelona, August 2003:

„Detection of conformational changes during NtCDPK2 activation using the split-ubiquitin system“

Vortrag bei der Jahrestagung des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln, September 2003:

„Detection of NtCDPK2 conformational changes using the split-ubiquitin system“

Poster-Präsentation bei der Botanikertagung in Braunschweig, September 2004:

„Conformational Changes of NtCDPK2 in vivo – Detection of Intra-Molecular Protein Domain Interactions“

Vortrag beim Sonderforschungsbereich SFB 635 in Dabringhausen, Februar 2005:

„Posttranslational regulation of CDPK activity by phosphorylation and conformational changes“

Poster-Präsentation beim „XVII International Botanical Congress“ in Wien, Juli 2005:

„Characterisation of calcium-dependent protein kinase (CDPK) isoforms in stress responses“

8.5 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„In vivo-Untersuchungen von Konformations-Änderungen
der Calcium-abhängigen Protein-Kinase NtCDPK2
aus *Nicotiana tabacum*“**

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.

Marburg, den 16.09.2005

