

# Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.  
an der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Universität Ulm

## Molekulare Funktionsanalyse von Signaltransduktionssystemen in *Arabidopsis thaliana*

vorgelegt von  
Verónica Albrecht  
aus Montevideo / Uruguay

Abteilung Molekulare Botanik, Universität Ulm

Ulm, Juni 2002



**Erstgutachter:** Prof. Dr. A. Brennicke

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. K.-D. Spindler

**Drittgutachter:** PD. Dr. K. Harter

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften: Prof. Dr. W. Witschel

Tag der Promotion: 24. Juli 2002

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ulm, im Juni 2002.....



---

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung 1

1.1	Kalzium, ein wichtiger sekundärer Botenstoff für Signalleitungen .....	1
1.2	Kalzium-bindende Proteine – Regulatoren der besonderen Art .....	4
1.3	Signalleitung durch Zwei-Komponenten-Systeme .....	7
1.4	Zielstellung dieser Arbeit .....	9

## 2 Material 11

2.1	Kommerzielle Kits und Hilfsmittel .....	11
2.2	Computerprogramme und Datenbanken .....	11
2.3	Geräte für die Mikroskopie .....	12
2.4	Medien .....	12
2.5	Lösungen.....	13
2.6	Bakterien- und Hefe-Stämme .....	14
2.7	Pflanzenmaterial.....	14
2.8	Vektoren.....	15
2.9	Oligonukleotide.....	16

## 3 Methoden 17

3.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	17
3.1.1	Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	17
3.1.2	Herstellung elektrokompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	18
3.2	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) .....	18
3.2.1	PCR an cDNA .....	18
3.2.2	Kolonie-PCR .....	20
3.2.3	PCR an genomischer DNA.....	20
3.2.4	PCR zur Deletionsmutagenese .....	21
3.3	Klonierung der cDNA von Genen .....	21
3.3.1	Verdau von DNA .....	21
3.3.2	Ligation von DNA .....	22
3.3.3	Fällung von DNA .....	22
3.3.4	Transformation in <i>E. coli</i> .....	23
3.3.5	Isolation von Plasmiden aus Bakterien .....	23
3.3.6	Sequenzierung von DNA.....	23
3.4	DNA – Präparation und Analyse.....	25
3.4.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
3.4.2	Reinigung der isolierten gDNA .....	26
3.4.3	Southern-Analyse von genomischer DNA .....	27
3.5	RNA – Präparation und Analyse.....	29
3.5.1	Isolation der RNA .....	29
3.5.2	Northern-Analyse .....	30
3.5.3	Reverse Transkription .....	32
3.6	Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.....	33
3.6.1	Grundlagen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systemes .....	33
3.6.2	Transformation von Hefen.....	34
3.6.3	Protein-Protein-Interaktionsassays .....	35
3.7	Pflanzentransformation .....	37
3.7.1	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	37
3.7.2	Transiente Pflanzentransformation .....	38
3.7.3	Stabile Pflanzentransformation .....	38

3.7.4	Selektion transgener Pflanzen.....	39
3.8	Isolierung von T-DNA-Insertionsmutanten.....	40
3.9	Hypokotylen-Assay.....	43
3.10	Verwendete Methoden zur Färbung von Pflanzenmaterial.....	46
3.10.1	GUS-Färbung.....	46
3.10.2	Lactophenol-Trypanblau-Färbung.....	47
3.10.3	Anillinblau-Färbung.....	47
3.10.4	DAB-Färbung.....	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse 49</b>	
4.1	Molekulare Analyse von Kalzium-Sensoren und deren interagierenden Protein-Kinasen.....	49
4.1.1	Analyse von AtCBL1 und AtCIPK1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	49
4.1.2	Subzelluläre Lokalisation der CBL1- und CIPK1-Proteine.....	63
4.1.3	AtCBL1 zieht AtCIPK1 an die Plasmamembran.....	65
4.1.4	Die NAF-Domäne von AtCIPK1 ist ein spezifisches Protein-Protein-Interaktionsmodul.....	66
4.1.5	Die AtCBL- und AtCIPK-Proteinfamilien.....	72
4.1.6	Die AtCBLs und AtCIPKs interagieren spezifisch miteinander.....	77
4.1.7	Analyse der Promotor-Regionen der AtCBLs und AtCIPKs.....	81
4.2	Molekulare Analyse des Response Regulators AtARR2.....	86
4.2.1	Isolation und Charakterisierung der arr2-Mutante.....	86
4.2.2	Phänotypische Analyse der arr2-Mutante.....	90
<b>5</b>	<b>Diskussion 97</b>	
5.1	Kalzium-Sensoren und deren interagierende Protein-Kinasen.....	97
5.2	Analyse des Response-Regulators ARR2.....	105
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung 111</b>	
<b>7</b>	<b>Summary 113</b>	
<b>8</b>	<b>Literatur 115</b>	
<b>9</b>	<b>Anhang 121</b>	
9.1	Liste der Primer.....	121
9.2	Lebenslauf.....	125
9.3	Abkürzungen.....	126
9.4	Veröffentlichungen.....	128





---

# 1 Einleitung

Pflanzen müssen sich aufgrund ihrer sessilen Lebensweise an sich ständig verändernde Umweltbedingungen anpassen. Diese unterschiedlichen Stimuli werden in biotische und abiotische Reize eingeteilt (Schopfer und Brennicke, 1999; Sanders *et al.*, 2002). Als abiotische Stimuli werden unter anderem unterschiedliche Lichtreize, niedrige und hohe Temperaturen, Berührung, hyperosmotischer (Salz, Trockenheit) und oxidativer (Ozon, Radikale) Stress zusammengefasst. Durch Pilze verteilte Elicitoren, NOD-Faktoren oder auch Hormone wie Abscisinsäure oder Gibberellinsäure werden dagegen zu den biotischen Reizen gezählt (Malhó, 1999; Knight und Knight, 2001; Sanders *et al.*, 2002). Verschiedene nicht-proteinische Botenstoffe ermöglichen in der Pflanze die Weiterleitung von Signalen in Antwort auf diese Fülle von Reizen. Zu diesen Botenstoffen gehören zum Beispiel zyklische Nukleotide, Wasserstoff-Ionen, aktive Sauerstoff-Arten, Lipide und als einer der wichtigsten Kalzium-Ionen (Wu *et al.*, 1997; Bowler und Fluhr, 2000; Sanders *et al.*, 2002).

## 1.1 Kalzium, ein wichtiger sekundärer Botenstoff für Signalleitungen

Externe Reize, die den Wuchs oder die Lebensfähigkeit der Pflanze beeinflussen können, müssen schnell und effizient erkannt und in interne Signale umgewandelt werden, um wirkungsvoll auf diese Veränderungen reagieren zu können. Obwohl der Pflanze eine ganze Reihe von Botenstoffen zur Verfügung stehen, spielt neben Hormonen wie Ethylen, Jasmonsäure, Salicylsäure und Abscisinsäure vor allem Kalzium als einer der wichtigsten Botenstoffe in der Signalweiterleitung eine wichtige Rolle. Diese Ionen wurden sowohl bei zellulären und entwicklungsphysiologischen Prozessen als auch in verschiedenen Reizantworten nachgewiesen (Ehrhardt *et al.*, 1996; Dong, 1998; Snedden und Fromm, 1998; Malhó, 1999; Bowler und Fluhr, 2000; Knight und Knight, 2001). So wurde gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in zellulären Vorgängen wie Zellführung bei Pollenschlauchwachstum oder Wurzelhaarverlängerungen notwendig sind (Bibikova *et al.*, 1997; Messerli *et al.*, 2000). Aber auch physiologische Prozesse wie NOD-Faktor-Erkennung, Seneszenz,

Transduktion abiotischer Reize oder auch Weiterleitung von Abscisinsäure- (ABA), Gibberellinsäure- (GA) oder Ethylensignalen werden durch Kalzium vermittelt (Ehrhardt *et al.*, 1996; Malhó, 1999; Bowler und Fluhr, 2000; Larkindale und Knight, 2002; Sanders *et al.*, 2002). Wie kann ein einziges Ion eine solche Vielfalt an Signalen vermitteln? Kalzium-Ionen haben einen großen Radius, der vielen verschiedenen Proteinen eine Bindung mit diesem Ion vereinfacht. Dieser Effekt wird noch dadurch erhöht, dass Kalzium unterschiedliche Bindungszahlen aufweisen kann, so dass die Ionen sich auch an Proteine mit unterschiedlichen Bindungsstellen anlagern können (Malhó, 1999). Durch die Beteiligung von Kalzium-Ionen an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen kommt es möglicherweise zu Überlagerungen verschiedener Signale in der Pflanzenzelle. Wie wird also klar, welches der ursprüngliche Reiz ist und wie erhält die Zelle die Information für die jeweils für den Reiz notwendige Antwort? Schon auf der Ebene der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind Möglichkeiten vorhanden, Spezifität zu erzeugen. So kann das räumliche Auftreten des Signals die Überschneidungen von Signalübertragungen einschränken. Die Zelle besitzt mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, aus denen Kalzium-Ionen freigesetzt werden können. Zu diesen zählen die Zellwand, das Endoplasmatische Retikulum (ER), Mitochondrien oder die Vakuole (Knight *et al.*, 1997; McAinsh und Hetherington, 1998; Malhó, 1999; Sanders *et al.*, 2002). Auf dieser Stufe der Regulation haben sich auch Spezialisierungen auf bestimmte Botenstoffe für die Freisetzung von Kalzium aus entsprechenden Kanälen erkennen lassen. So wurden sowohl Inositol-1,4,5-Tris-Phosphat ( $\text{IP}_3$ ) als auch zyklische Adenosin-5'-Diphosphat-Ribose (cADPR) als Regulatoren für Kalzium-Kanäle der Vakuole verifiziert, während die entsprechenden Kanäle des ER durch Nikotinsäure-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat (NAADP) reguliert werden (Wu *et al.*, 1997; Navazio *et al.*, 2000). Durch die Herstellung transgener Pflanzen, die das Reporterogen Aequorin exprimieren, wurden weiterhin Unterschiede in den dynamischen Eigenschaften in der Magnitude und Kinetik der Kalzium-Freilassung bei diversen Stressreizen festgestellt (Allen *et al.*, 1999; Plieth *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2001; Harper, 2001; Knight und Knight, 2001; Sanders *et al.*, 2002). Auf diese Weise wurde eine deutliche Zwei-Phasen-Kinetik des Kalzium-Signals bei lang anhaltender Kälte-Behandlung beobachtet (Plieth *et al.*, 1999). Ebenso wurde nachgewiesen, dass im Anschluss einer Hitze-Behandlung die Kalzium-Konzentration drastisch und rapide ansteigt (Larkindale und Knight, 2002). Obwohl  $\text{Ca}^{2+}$  ein wichtiger Botenstoff ist, löst dieses Ion häufig nur unvollständige

---

Signal-Antworten aus, so dass Kalzium-abhängige Systeme noch zusätzlich ein zweites parallel laufendes Signal brauchen, welches zu der spezifischen Weiterleitung der Signale beiträgt (Sanders *et al.*, 2002). So wurde neben der Induktion der Kalzium-Freisetzungen aufgrund spezifischer Reize auch ein Ansteigen der Konzentration verschiedener pflanzlicher Hormone festgestellt. Zu diesen Hormonen in Pflanzen gehören vor allem Jasmonsäure (JA), Ethylen, Salicylsäure (SA) und Abscisinsäure (ABA) (Bohnert und Sheveleva, 1998; Dong, 1998; Leon *et al.*, 1998; Löbler und Lee, 1998; Pieterse und van Loon, 1999). Die Synthese der Hormone Jasmonsäure, Ethylen und Salicylsäure wird bei Pathogenbefall und in Antwort auf Verwundung durch Frassfeinde wie Raupen induziert (Reinbothe *et al.*, 1994; Leon *et al.*, 1998; Pieterse und van Loon, 1999; Onate-Sanchez und Singh, 2002). Die Synthese von Abscisinsäure wird dagegen bei Trockenheit und Salz erhöht (Ingram und Bartels, 1996; Hetherington, 1998; Xiong *et al.*, 2001). Zwischen den einzelnen Hormon-Signalwegen herrscht keine Linearität, sondern ein stetiger Austausch von Informationen beziehungsweise eine häufige Überkreuzung der Signale und auch gegenseitige Wechselwirkungen. So sind Induktionen der Expression bestimmter Gene sowohl durch ABA als auch durch JA beschrieben worden (Löbler und Lee, 1998). Ebenso wurde eine negative Beeinflussung des ABA-Signales während der Samenkeimung durch Ethylen nachgewiesen (Xiong *et al.*, 2001). Andererseits kann Ethylen auch die Bildung von ABA beschleunigen (Bowler und Fluhr, 2000). Es besteht also ein reger Austausch an Informationen zwischen den Hormonsignalwegen, ein sogenannter „Cross-talk“. Eine Art „Cross-talk“ zwischen den Hormon-Signalwegen und denen des Kalziums ist ebenso nachgewiesen worden. So zeigt die *gca*-Mutante, die ABA-insensitiv ist, ein verändertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationsverhalten in den Stomatazellen als der untersuchte Wildtyp (Allen *et al.*, 2001). Ebenfalls in den Schliesszellen ist eine Regulation der Kaliumkanäle sowohl durch ABA als auch durch Kalzium nachgewiesen worden (Blatt, 2000). Da Zugabe sowohl von Kalzium-Ionen als auch von SA, Ethylen oder ABA die Überlebensrate von Keimlingen nach Hitze-Behandlung erhöht, scheint auch ein „Cross-talk“ bei Hitze-Stress zu existieren (Larkindale und Knight, 2002).

## 1.2 Kalzium-bindende Proteine – Regulatoren der besonderen Art

Da Kalzium-Ionen in höheren Konzentrationen toxisch für die Zelle sind, liegen diese nur in geringen Mengen frei im Zytosol der Zelle vor (Malhó, 1999). Dadurch reichen schon geringste Änderungen in der lokalen Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, um Signale auszulösen, die von Kalzium-bindenden Proteinen detektiert werden können. In der Pflanze wurden in den letzten Jahren eine ganze Reihe verschiedener Kalzium-bindender Proteine identifiziert (Liu und Zhu, 1998; Snedden und Fromm, 1998; Kudla *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000; Knight und Knight, 2001; Sanders *et al.*, 2002). Diese Kalzium-Sensoren werden in zwei Gruppen eingeteilt (Sanders *et al.*, 2002). Die eine Gruppe stellen die Antwort-Sensoren („response sensors“) dar, die durch Bindung von Kalzium ihre Struktur und ihre enzymatische Aktivität ändern und damit eine direkte Weiterleitung des Signales bewirken. Zu dieser Gruppe der Kalzium-Antwort-Sensoren werden unter anderem die Kalzium-abhängigen Protein-Kinasen (CDPK, calcium dependent protein kinases) gezählt. Die zweite Gruppe sind die Übermittler-Sensoren („sensor relais“). Diese Proteine binden zwar  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, weisen aber keine eigene enzymatische Aktivität auf. Erst nach der Kalzium-Bindung binden diese Übermittler-Sensoren an andere Proteine und beeinflussen dadurch deren Aktivität. Zu dieser zweiten Gruppe gehören sowohl die zur Familie der Calmoduline (CaM) zählenden Proteine als auch die Calcineurin B-ähnlichen (CBL) Proteine (Kudla *et al.*, 1999; Luan *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002).

Die zu den Antwort-Sensoren gehörenden CDPKs bilden in *Arabidopsis* eine große Proteinfamilie mit bisher 34 identifizierten Mitgliedern (Harmon *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2002). Interessanterweise ist diese Gruppe von Kinasen bisher nur in Pflanzen und einigen Protozoen nachgewiesen worden (Harmon *et al.*, 2000). Diese Protein-Kinasen weisen als gemeinsame Struktur eine N-terminale Kinase-Domäne und eine C-terminale Calmodulin-ähnliche Domäne (39 % Identität zu CaM) mit vier EF-Händen auf (Snedden und Fromm, 1998; Hardie, 1999; Harmon *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2002). Die EF-Hand-Motive bilden eine „Helix-Loop-Helix“-Struktur die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verantwortlich ist (Snedden und Fromm, 1998). Lipidmodifikationen wie Myristylierungen einiger CDPKs vermitteln eine Membranlokalisation dieser Proteine (Harmon *et al.*, 2000). Auch in anderen Kompartimenten der Zelle wie dem Endoplasmatischen Retikulum sind CDPKs nachgewiesen worden (Hwang *et al.*, 2000; Martin und Busconi, 2000; Sanders *et*

---

*al.*, 2002). Diese Protein-Kinasen sind verschiedenen Regulationsmechanismen unterworfen und zeigen eine zelltyp- und entwicklungspezifischen Regulation (Hardie, 1999; Harmon *et al.*, 2000; Martin und Busconi, 2000; Saijo *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2002). In NbCDPK2-Überexpressionslinien in *Nicotiana benthamiana* konnte nachgewiesen werden, dass die Autophosphorylierung und Aktivität der Kinase von einer weiteren Kinase reguliert wird (Romeis *et al.*, 2001). Eine Regulation sowohl auf RNA-Ebene durch gesteigerte Transkription bei bestimmten Reizen als auch auf Protein-Ebene durch schnellen Abbau wurde für OsCDPK7 aus Reis beschrieben (Saijo *et al.*, 2000). Diese CDPK-Proteine sind bei verschiedenen Stressantworten beteiligt. CDPKs regulieren z.B. verschiedene Transporter, wie etwa die im Endoplasmatischen Retikulum vorkommende Kalzium-Pumpe ACA2, die für eine Osmoregulation wichtig ist (Harmon *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2000; Saijo *et al.*, 2000).

Neben den Antwort-Sensoren gibt es eine weitere Gruppe von Kalzium-Sensoren, die zwar das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal empfangen, aber erst durch die Bindung an andere Proteine deren Aktivität beeinflussen. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem die Proteinfamilie der Calmoduline (CaM). Diese setzt sich aus den CaM-Proteinen, den CaM-ähnlichen und den CaM-verwandten Proteinen zusammen und besteht in *A. thaliana* aus vierzehn identifizierten Mitgliedern (Luan *et al.*, 2002). Dabei stellen diese mit 90% Ähnlichkeit untereinander eine sehr konservierte Protein-Familie im pflanzlichen und tierischen Bereich dar (Snedden und Fromm, 1998; Luan *et al.*, 2002). CaM-Proteine besitzen ebenso wie die vorher erwähnten CDPKs vier EF-Hand-Motive für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung, wobei im Gegensatz zu anderen Kalzium-Sensoren die Bindung  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig ist (Snedden und Fromm, 1998; Luan *et al.*, 2002). Überexpression des CaM3-Proteines in *Arabidopsis* zeigte, dass dieses Protein für die Regulation der Expression stressinduzierter Gene wie RD29A (=LTI78=COR78) oder KIN1/KIN2 (=COR6.6) verantwortlich ist (Townley und Knight, 2002). Ebenso wird eine Beteiligung von Calmodulinen bei der Reizantwort auf Hitze vermutet, da Zugabe von Calmodulinblocker die Antworten auf diesen Reiz verstärkt durch Ansteigen der Konzentration von TBARS (Thiobarbitursäurezahl) und damit verbundenen oxidativen Stress (Larkindale und Knight, 2002). Involviert sind verschiedene CaMs in der Vermittlung von weiteren Stressantworten wie etwa bei Pathogenbefall oder bei Verwundung. Ebenso regulieren diese CaMs verschiedene

Proteine wie unter anderem einige CDPKs (Snedden und Fromm, 1998; Harmon *et al.*, 2000; Luan *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002).

Eine weitere Proteinfamilie in Pflanzen, die zu dieser zweiten Gruppe von Sensor-Übermittlern gehört, stellen die Calcineurin B-ähnlichen Proteine dar. Diese Proteine wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Calcineurin B-Untereinheiten als CBL (Calcineurin B like) bezeichnet, weisen aber zusätzlich noch eine hohe Ähnlichkeit zu einem neuronalen Kalzium-Sensor-Protein (NCS) auf (Kudla *et al.*, 1999; Luan *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum tierischen Calcineurin B besitzen CBL-Proteine statt vier nur drei EF-Hand-Motive (Kudla *et al.*, 1999; Luan *et al.*, 2002). Das tierische Calcineurin besteht aus zwei Untereinheiten, den Untereinheiten Calcineurin A (CNA) und Calcineurin B (CNB). Die katalytische Calcineurin A-Untereinheit besitzt ein Zentrum für  $\text{Fe}^{3+}/\text{Zn}^{2+}$ -Bindung, während die zweite Untereinheit, Calcineurin B vier EF-Hand-Motive aufweist und die regulatorische Untereinheit darstellt (Klee *et al.*, 1998; Trewavas, 1999). Beide Untereinheiten sind bei Hefe und im Tierreich hoch konserviert. Das Calcineurin besitzt bei Säugetieren wichtige Funktionen in der T-Zell-Aktivierung und in der Transmitter-Ausschüttung der Hippokampus-Neuronen, während bei Hefen Beteiligung von Calcineurin im Pheromon-Antwort-Weg, in der Zytokinese, der Sporulation als auch in adaptiven Prozessen bei Salzstress nachgewiesen worden ist (Breuder *et al.*, 1994; Klee *et al.*, 1998; Hemenway und Heitman, 1999; Trewavas, 1999). Als einzige Serin-Threonin-Phosphatase wird das tierische Calcineurin von  $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$  aktiviert (Klee *et al.*, 1998). Während das tierische Calcineurin in vielen Studien genau untersucht worden ist, war zu Beginn dieser Arbeit für die CBLs bisher noch nicht viel über ihre Funktionen in der Pflanze bekannt. Für CBL1 aus *A. thaliana* wurde eine Expression in Stengel und Wurzel, zu geringerem Anteil in Blättern und kaum in Blüten nachgewiesen. Weiterhin wurde ein transienter Anstieg der mRNA von AtCBL1 bei Trockenheit, Kälte und Verwundung beobachtet werden, der bei den beiden sehr ähnlichen AtCBL2 und AtCBL3 nicht zu erkennen war (Kudla *et al.*, 1999). In einer späteren Arbeit wurde sowohl für CBL1 als auch für CBL2 eine Induktion bei Licht festgestellt (Nozawa *et al.*, 2001). Die molekulare Analyse des „salt overly sensitive“ Lokus aus *A. thaliana* ergab, dass dieses für die Salzresistenz von *Arabidopsis* essentielle Protein ebenfalls ein Kalzium-Sensor des CBL-Typs ist (Liu und Zhu, 1997). Mit der Komplettierung der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms wurden insgesamt 10 Mitglieder dieser Protein-Familie identifiziert (Nozawa *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 2002).

Durch Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit CBL1 als Köder wurde überraschenderweise statt der erwarteten CNA eine neue Familie von Serin-Threonin-Protein-Kinasen als Interaktoren identifiziert. Diese Proteine wurden als CIPKs (CBL-interacting protein kinases) bezeichnet. Alle CIPKs weisen eine Zwei-Domänen-Struktur auf. Der N-Terminus besteht aus der Kinase-Domäne, die Ähnlichkeiten zu SNF-ähnlichen und AMPK-abhängigen Kinasen aufweist (Hardie, 1999; Shi *et al.*, 1999). Die zweite Domäne in der C-terminalen Region ist dagegen sehr variabel. In *in vitro*-Analysen wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Interaktion von CBL1 und CIPK1 festgestellt. Allerdings blieben sowohl die Funktionen als auch die Komplexität der CBL/CIPK-Interaktionen und das möglicherweise daraus resultierende Signalsystem unklar (Shi *et al.*, 1999). Die Analyse der Funktionen dieser Proteine als auch die CBL/CIPK-Interaktionen stellen einen Teil der Fragestellungen dieser Arbeit dar.

### 1.3 Signalleitung durch Zwei-Komponenten-Systeme

Im letzten Jahrzehnt wurden in Pflanzen eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die ursprünglich in Bakterien beschrieben und untersucht wurden (Stock *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1993). In Bakterien sind diese Proteine Teile sogenannter „Zwei-Komponenten-Systeme“ die Prozesse wie Chemotaxis, in *E. coli* die aerobisch-anaerobische Regulierung und in *B. subtilis* die Regulation der Sporulierung vermitteln. Die bakteriellen Zwei-Komponenten-Systeme bestehen aus einer Histidin-Kinase und einem „Response-Regulator“. Die Histidin-Kinase autophosphoryliert sich selbst an einem bestimmten Histidin in ihrer Aminosäure-Kette und gibt in einem zweiten Schritt dieses Phosphat an den Response-Regulator weiter, indem sie hier ein Asparagin phosphoryliert. Dieser Response-Regulator wird in einem dritten Schritt wieder dephosphoryliert. Die Existenz derartiger Systeme wurde in Eukaryoten nur in Hefe und in Pflanzen nachgewiesen (Maeda *et al.*, 1994; Stock *et al.*, 2000; Hwang und Sheen, 2001). Pflanzen weisen häufig ein komplexeres Zwei-Komponenten-System als in Bakterien auf, das weitere Regulationen ermöglicht. So wurden einige Histidin-Kinasen identifiziert, die statt dem ursprünglichen Aufbau, bestehend aus einer Eingabe- (Input) und Ausgabe- (Output) Domäne, eine weitere regulatorische Domäne mit einem Asparagin aufweisen. Diese veränderten Kinasen werden als Hybrid-Histidin-Kinasen bezeichnet (Stock *et al.*, 2000). Ein weiterer Zwischenschritt des Phosphotransfers bilden sogenannte Histidin-Phospho-Transfer-

Proteine. Der Phosphotransfer findet hier zuerst innerhalb der Histidin-Kinase statt, bevor die Phosphatgruppe auf das Histidin-Phospho-Transfer-Protein transferiert und von da aus auf den Response Regulator weitergegeben wird. Es findet also anstatt einem einfachen His-Asp- ein His-Asp-His-Asp-Phosphotransfer statt, der als Multistep-Zwei-Komponenten-System bezeichnet wird (Stock *et al.*, 2000; Lohrmann und Harter, 2002). In der Pflanze sind bisher elf Histidin-Kinasen beziehungsweise Hybrid-Histidin-Kinasen beschrieben worden, die entweder als Osmosensoren oder als Ethylen- oder Cytokinin-Rezeptoren fungieren. Zu den Cytokinin-Rezeptoren gehören CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 als auch die Ethylen-Rezeptoren ETR1, ETR2, ERS1 und ERS2 sowie EIN4 (Gamble *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, in revision). Die Funktion von ETR1 in der Ethylen-Antwort als Ethylen-Rezeptor wurde schon Ende der achziger Jahre aufgedeckt (Bleecker *et al.*, 1988). Dabei ergab die Analyse von Mutanten, dass diese den normalerweise bei etiolierten Keimlingen auftretenden „Triple Response“ bei Einwirkung von Ethylen nicht zeigten. Bei der „Dreifach-Antwort“ handelt es sich um eine gleichzeitige Inhibition des Wurzelgeotropismus, sowie der Wurzel- und Hypokotylenverlängerung und der Öffnung des apikalen Hakens der Keimlinge (Bleecker *et al.*, 1988; Guzman und Ecker, 1990; Fluhr, 1998). Aufgrund von Veränderungen in der "Triple Response" wurden auch die Mutanten *ein2*, *ein3*, *ctr1* als auch *erf1* isoliert (Guzman und Ecker, 1990; Kieber *et al.*, 1993). Weitere Analysen liefern Hinweise auf einen MAP-Kinase-Weg, der vermutlich von ETR1 ausgeht und über die RAF-ähnliche-Kinase CTR1 diesen hypothetischen MAP-Kinasen-Weg aktiviert. Über den hypothetischen MAP-Kinasen-Weg, dessen Komponenten bisher noch nicht identifiziert wurden, wird ein NRAM-ähnlichen Transporter, EIN2, aktiviert. Dieser gibt das Signal weiter in den Nukleus an den Transkriptionsfaktor EIN3, der unter anderem an den Promotor von ERF1 bindet und damit die Expression dieses Genes reguliert (Chang und Shockey, 1999; Bleecker und Kende, 2000). CTR1 agiert in diesem Ethylen-Signalweg als ein negativer Regulator (Fluhr, 1998). Obwohl ETR1 eine Histidin-Kinase darstellt, ist bisher keine Funktion dieses Proteins in einem möglichen Zwei-Komponenten-System nachgewiesen worden. Aber es gibt Hinweise, dass in Pflanzen funktionelle Zwei-Komponenten-Systeme existieren müssten, da weitere Komponenten identifiziert wurden. So sind im *Arabidopsis*-Genom fünf Histidin-Transfer-Proteine vorhanden, die als AHP1 bis 5 bezeichnet werden. Der letzte Schritt des Multi-Step-Zwei-

---

Komponenten-Systemes ist der Phospho-Transfer auf Response-Regulatoren. Insgesamt sind 22 Response Regulatoren identifiziert worden, die in zwei Gruppen eingeteilt werden, den Typ A-Response-Regulatoren, die neben der Receiver-Domäne eine kurze N- und C-terminalen Verlängerung aufweisen, und den Typ B-Response-Regulatoren, die eine lange C-terminale Verlängerung mit einer Helix-Loop-Helix-Struktur besitzen und wahrscheinlich als Transkriptionsfaktoren fungieren (Hwang und Sheen, 2001; Lohrmann *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2002; Lohrmann und Harter, 2002; Schaller *et al.*, in revision). Für den Typ A Response-Regulator ARR4 wurde eine Funktion zur Stabilisierung der aktiven Pfr-Form des Phytochrom B-Photorezeptors nachgewiesen (Sweere *et al.*, 2001). Ein weiterer Response-Regulator vom Typ B, ARR2, wurde dagegen als Transkriptionsfaktor identifiziert, der mitochondriale Komplex I-Gene während der Spermatogenese der Pollen reguliert (Lohrmann *et al.*, 2001). Gegenwärtig sind allerdings für die meisten dieser Proteine weder die Funktion noch deren Beteiligung und Aufbau eines Zwei-Komponenten-Systemes bekannt. Durch die Analyse des ARR2-Proteines soll ein Zugang zur Identifizierung eines solchen Zwei-Komponenten-Systemes gefunden und seine Funktion in der Pflanze genauer untersucht werden.

#### **1.4 Zielstellung dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei neuartige Signaltransduktionssysteme aus der Pflanze untersucht werden. Einen Schwerpunkt bildete die funktionelle Analyse von AtCBL1 und AtCIPK1. Um die Funktion dieser beiden Proteine *in planta* aufzuklären sollten T-DNA-induzierte Mutanten isoliert und charakterisiert werden. Die Funktionsmechanismen des CBL/CIPK-Signalsystemes bilden einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit und sollen anhand von Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System analysiert werden. Um die Funktion des Response-Regulators ARR2 in der Pflanze genauer zu untersuchen, soll in dieser Arbeit eine Transposon-induzierte Mutante isoliert und charakterisiert werden.



---

## 2 Material

### 2.1 Kommerzielle Kits und Hilfsmittel

Für viele Methoden der Molekularbiologie existieren inzwischen käufliche Reagenzien und Materialien. Diese Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

- Reinigung von DNA aus Agarosegelen und Lösungen: „GFX Gel Purification Kit" (Amersham Pharmacia GmbH)
- Plasmidpräparationen: „GFX Micro Plasmid Preparation Kit" (Amersham Pharmacia GmbH); „Plasmid Midi und Maxi Kit" (Qiagen)
- Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten: „Random Prime Labeling Mix" (Amersham Pharmacia GmbH)
- Sequenzreaktionen: „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" (Amersham Pharmacia GmbH)

### 2.2 Computerprogramme und Datenbanken

Für die Sequenzauswertung und –analyse wurden folgende Programme und Datenbanken verwendet:

- für Sequenzanalysen: DNASTAR (Lasergene)
- Datenbank-Recherchen: "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Phylogenetische Analysen: PAUP 4.0 (<http://www.lms.si.edu/PAUP/>)
- Bestimmung des Schmelzwertes von Oligonukleotiden:  
<http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>

## 2.3 Geräte für die Mikroskopie

- Mikroskop: Axioplan von Zeiss (Carl Zeiss GmbH)
- Kamera: 3CCD Color Video Camera (Sony Electronics Inc.)
- Filter: GFP-Filter mit Anregungsfilter D 935x, Strahlenteiler 440DCPL und Sperrfilter HQ 10/50 bzw. GG475LP

## 2.4 Medien

Verwendete Standardmedien:

### LB-Medium

- 1 % NaCl (w/v)
- 1 % Casein Hydrolysat (w/v)
- 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v)
- bei Platten 2 % Agar (w/v)

### YPD-Medium

- 1 % Hefe-Extrakt (w/v)
- 2 % Bacto-Peptide (w/v)
- 2 % Glucose (w/v)
- bei Platten 2 % Agar

### SD-Medium

- 1 x YNB („Yeast Nitrogen based“)
- 1 x SD („synthetic dropout powder“)
- 50 g Saccharose
- 0,25 g MES
- ad 1 l H<sub>2</sub>O

### YEB-Medium

- 0,5 % Beef Extrakt (w/v)
- 0,1 % Hefe-Extrakt (w/v)
- 0,1 % Pepton (w/v)
- 0,5 % Saccharose (w/v)
- 50 mM MgSO<sub>4</sub>
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
- 1,5 % Agar für Platten

### MS-Medium

- 1 x Murashige & Skoog-Medium mit Vitaminen
- 1,5 % Saccharose (w/v)
- 2,5 mM MES
- 0,8 % Agar (w/v)

Antibiotika

(verwendete Endkonzentration)

100 µg/ml	Ampicillin
50 µg/ml	Kanamycin
100 µg/ml	Rifampicin
25 µg/ml	Gentamycin

**2.5 Lösungen**

Eingesetzte Stamm- und Standardlösungen:

Ladepuffer

0,1 M EDTA  
 50 % Glycerin  
 Bromphenolblau (Spatelspitze)

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0  
 1 mM EDTA

20 x SSC

0,3 M Natrium-Citrat  
 1,5 M NaCl  
 1 % SDS

20 x SETS-Puffer

3 M NaCl  
 20 mM EDTA  
 0,6 M Tris/HCl pH 8,0  
 11 mM Tetranatrium-Pyrophosphat

100 x Denhardts-Lösung

5 g Ficoll (400)  
 5 g PVP 360  
 5 g BSA  
 ad 250 ml H<sub>2</sub>O

ssDNA

10 mg/ml ultraschall-gescherte  
 Lachssperma-DNA

## 2.6 Bakterien- und Hefe-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterien- und Hefe-Stämme verwendet:

*E. coli*:

XL1Blue (Bullock *et al.*, 1987):

RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F'proAB lac<sup>r</sup>ΔM15  
Tn10 (Tet<sup>r</sup>))

sure (Doherty *et al.*, 1993):

E14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) D(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi1 gyrA96 relA1 lac  
recB recJ sbcC umu::Tn5 (Kann<sup>r</sup>) uvrC (F'proAB lac<sup>r</sup>Δ□□□ Tn10(Tet<sup>r</sup>))

*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz und Schell, 1986):

GV3101 pMP90: Rif<sub>100</sub> und Kan<sub>25</sub> (für Kanamycin-Selektion)

GV3101 pMP90 RK: Rif<sub>100</sub>; Gm<sub>25</sub>; Km<sub>25</sub> (für Ampicillin-Selektion)

*Saccharomyces cerevisiae*:

SMY3 (Cardenas *et al.*, 1994):

MATa trp-901 his3 leu2-3,112 ura3-52 ade2 gal4 gal 80 TOR1-3 cnb::ADE2

PJ69-4A (James *et al.*, 1996):

MATa gal4 gal80 his3-200 trp-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112 GAL2-ADE2  
LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ

## 2.7 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Pflanzen der Ökotypen Columbia, Wassilewska und Landsberg erecta der Art *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn.) untersucht. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte entweder unter Kurztagsbedingungen bei 8 Stunden Licht und 16 Stunden Dunkelheit oder unter Langtagsbedingungen bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit bei 20°C.

## 2.8 Vektoren

Die verwendeten Vektoren werden in Tab. 1 zusammengefasst.

Vektor	in <i>E.coli</i> -Stamm	Selektion in Bakterien	binär in	Selektion	Verwendung
PBluescript SK <sup>a</sup>	XL1 und Sure	Amp	-	-	Klonierung von DNA-Fragmenten
Xcm <sup>b</sup>	XL1 und Sure	Amp	-	-	Klonierung von PCR-Fragmenten
pGBT9.BS <sup>c</sup>	XL1 und Sure	Amp	Hefe	Trp	Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
pGAD.GH <sup>c</sup>	XL1 und Sure	Amp	Hefe	Leu	Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
002LOLA <sup>d</sup>	XL1 und Sure	Amp	Pflanze	Kan	Protein-Expression mit Myc-Epitop
pPCV812 <sup>d</sup>	XL1 und Sure	Amp	Pflanze	Hyg	Protein-Expression mit H::A.Epitop
pGPTV.X <sup>e</sup>	XL1	Kan	Pflanze	BASTA, Kan oder Hyg	Überexpression von Proteinen oder Promotor-GUS

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sowie deren Anwendung.

<sup>a</sup> Stratagene Inc, La Jolla, USA; <sup>b</sup> (Borovkov und Rivkin, 1997); <sup>c</sup> (Bartel und Fields, 1997); <sup>d</sup> (Ferrando *et al.*, 2000); <sup>e</sup> (Überlacker und Werr, 1996).

## **2.9 Oligonukleotide**

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang zusammengefasst. Oligonukleotide, die für Sequenzierungen verwendet wurden, wurden an ihrem 5'-Ende mit CY5 markiert und werden dem entsprechend in dieser Liste separat aufgeführt. Die Oligonukleotide stammen von den Firmen GIBCO, MWG, Roth und Invitrogen. Jene Oligonukleotide, die für die Herstellung der FLAG-Epitop-markierten Proteine und für die PCR zur Deletionsmutagenese eingesetzt wurden, stammen aus dem Labor von Dr. Gabor Igloi in Freiburg.

---

## 3 Methoden

### 3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Transformation und Vervielfältigung von Plasmiden werden *E. coli*-Bakterien verwendet. Um Pflanzen zu transformieren, wurden Agrobakterien benutzt, die die rekombinante DNA stabil in das Genom der Pflanzen einfügen können. Für die Transformationen wurden elektrokompente Bakterien eingesetzt, da eine Elektroporation eine höhere Transformationsrate gegenüber chemisch kompetenten Bakterien erzielt.

#### 3.1.1 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*

*E. coli*-Bakterien sind von Natur aus nur bedingt in der Lage DNA aufzunehmen und müssen aus diesem Grund diese Kompetenz für eine Transformation erwerben. Um für Elektroporationen gebrauchsfähige Bakterien herzustellen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 4 ml Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes bei 37°C über Nacht kultivieren
- überimpfen von 1 ml der Vorkultur in 1 l LB-Medium
- Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1,0 wachsen lassen
- steril in 500 ml Zentrifugenbecher überführen
- 20 min auf Eis inkubieren
- Zentrifugation bei 4°C und 4000 g für 15 min
- Pellet in 1 l eiskaltem Wasser resuspendieren
- Zentrifugation bei 4°C und 4000 g für 15 min
- Pellet in 0,5 l eiskaltem Wasser waschen
- Pellet in 20 ml kaltem 10% Glycerin aufnehmen
- Zentrifugation bei 4°C und 4000 g für 15 min
- Pellet in 2-3 ml kaltem 10 % Glycerin aufnehmen
- Bakterien in 200 µl Aliquots bei -80°C einfrieren

### 3.1.2 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* wurde entsprechend dem Protokoll von McGormac (McCormac *et al.*, 1998) vorgegangen:

- 4 ml Vorkultur der Agrobakterien über Nacht bei 28°C kultivieren
- überimpfen von 1 ml der Kultur in 200 ml YEB
- wachsen lassen der Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1,0
- Zentrifugation bei 4°C und 4000 g für 15 min
- Pellet in 200 ml kaltem 10 % Glycerin waschen
- Pellet in 100 ml kaltem 10 % Glycerin waschen
- Pellet in 2 ml kaltem 10 % Glycerin aufnehmen
- Bakterien in 100 µl Aliquots bei –80°C einfrieren

## 3.2 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation von gDNA, cDNA, zum Nachweis von Klonierungsereignissen sowie zur gerichteten Mutagenese eingesetzt.

### 3.2.1 PCR an cDNA

Die nach einer reversen Transkription (RT) aus mRNA erhaltene cDNA wurde sowohl für RT-PCR als auch für die Amplifikation der cDNA eines Genes verwendet. Der Ansatz einer reversen Transkription wird in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Für die Methode der Isolation der cDNA eines Genes stehen dem Labor mehrere cDNA-Banken zur Verfügung, die als Substrat der Reaktionen dienen:

cDNA -Bank aus etiolierten Keimlingen (Kim *et al.*, 1997)

cDNA -Bank aus grünem Gewebe aus *Arabidopsis* (Faure *et al.*, 1998)

Zur Isolation der cDNA eines Genes wurde folgender Ansatz verwendet:

Reaktionsmix: 10 µl 10x Puffer (PeqLab)  
 10 µl MgSO<sub>4</sub> (25 mM, PeqLab)  
 10 µl dNTP (2,5 mM, Gibco))  
 2,5 µl Primer-Vorwärts (100 pmol/µl)  
 2,5 µl Primer-Rückwärts (100 pmol/µl)  
 5 µl cDNA-Substrat (ca 3 ng)  
 2,5 µl Pwo-DNA-Polymerase (1 U/µl, PeqLab)  
 ad 100 µl H<sub>2</sub>O (steril)

Für die RT-PCR wurde der Reaktionsmix folgendermaßen verändert:

Reaktionsmix: 5 µl 10x Puffer (Promega)  
 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Promega)  
 5 µl dNTP (2,5 mM, Gibco))  
 1 µl Primer-Vorwärts (10 pmol/µl)  
 1 µl Primer-Rückwärts (10 pmol/µl)  
 3 ng RT  
 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Promega)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O (steril)

Für die PCR-Reaktionen wurde der Robocycler Gradient 96 (Stratagene) benutzt.  
 Die generellen PCR-Bedingungen waren:

	2 min	94°C (Denaturierung)
35 Zyklen:	45 sec	94°C (Denaturierung)
	1,30 min	58°C (Hybridisierung)
	1-2 min	72°C (pro 1 kb 1 min Elongationszeit)
abschließend:	5 min	72°C

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarose-Gel mit 10µl/100ml Ethidium-Bromid (0,1mg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt (für große Fragmente >1,5 kb wurde 0,8 %iges Agarosegel, für Fragmente <800 bp 1,5 – 2,0 %iges Agarosegel verwendet). Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden unter UV-Licht photographisch dokumentiert. Die Fragmente wurden wenn notwendig aus dem Gel

ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX Gel Purification Kit“ isoliert. Anschließend wurden die gereinigten DNA-Fragmente mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut, in entsprechende Vektoren ligiert und in *E. coli*-Bakterien transformiert.

### **3.2.2 Kolonie-PCR**

Die Kolonie-PCR erlaubt den Nachweis von in Vektoren klonierten DNA-Inserts in einzelnen Bakterienkolonien. Für die PCR wurden Vektor-spezifische Primer verwendet, die die Länge der DNA-Inserts widerspiegeln. Dazu wurde ein Teil einer Bakterienkolonie mit einem Zahnstocher gepickt, in den Reaktionsmix getaucht und dann die restlichen Bakterien auf dem Zahnstocher auf einer Rücklagenplatte ausgestrichen. Der Reaktionsmix und die PCR-Bedingungen waren wie unter 2.3.1 beschrieben.

### **3.2.3 PCR an genomischer DNA**

Nachweise von Mutationen, etwa T-DNA-Insertionen im Genom, erfolgen ebenfalls mit Hilfe der PCR. Dazu werden jeweils Primer verwendet, die entweder für die Insertion oder für das Gen spezifisch sind. Als Substrat wurde aus Pflanzen isolierte genomische DNA verwendet. Der PCR-Reaktionsmix entsprach dem der Kolonie-PCR, wobei 12 pmol statt 10 pmol der jeweiligen Primer verwendet wurden. Die PCR-Reaktion fand unter denselben Bedingungen wie unter 2.3.1 angegeben statt .

### 3.2.4 PCR zur Deletionsmutagenese

Zur gerichteten Mutagenese eines cDNA-Klones durch Deletion eines Teils der cDNA wird eine erweiterte Form der PCR an einer schon isolierten cDNA eines Genes durchgeführt. Dazu wurde die von Higuchi et al. (1988) ausführlich beschriebene und als „site overlap extension (SOE)“ bezeichnete Methode verwendet. Der Reaktionsmix entsprach dem der Isolierung der cDNA eines Genes und wurde unter den Bedingungen wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt.

## 3.3 Klonierung der cDNA von Genen

Auf die Klonierung eines durch PCR amplifizierten DNA-Fragmentes wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

### 3.3.1 Verdau von DNA

Für den Verdau von DNA wurden Restriktionsenzyme verwendet. Diese Enzyme erkennen und schneiden spezifische palindromische DNA-Sequenzen. Dabei können entweder glatte DNA-Enden („blunt end“) oder Enden mit überhängenden Nukleotiden („sticky end“) entstehen. Die jeweiligen Puffer wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Genereller Ansatz eines Restriktionsverdaus:

10 µl 10x Puffer  
1-2µl Enzym (5-10 U/µg DNA)  
1-5 µgDNA  
ad 100 µl H<sub>2</sub>O (steril)

Die DNA-Fragmente, die für eine Klonierung weiterverwendet wurden, wurden nach der Auftrennung im Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX Gel Purification Kit“ (Amersham Pharmacia) gereinigt.

### 3.3.2 Ligation von DNA

Nachdem die DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert wurden, wurden sie in einen mit den entsprechenden Enzymen verdauten Vektor ligiert. Dazu wurde eine DNA-abhängige Ligase verwendet, die beide DNA-Stränge von Insert und Vektor kovalent miteinander verbinden kann. Da in dieser Arbeit nur DNA-Fragmente mit Nukleotid-Überhängen verwendet wurden, wird nur auf eine dem entsprechende Ligation eingegangen.

Ansatz einer Ligation:

4 µl	5x Ligationspuffer
3 µl	verdauter Vektor (1-20ng)
12 µl	verdautes Fragment (10-100ng)
1 µl	T4-DNA-Ligase (2,5 U/µl)

Die Ligation wurde über Nacht bei 15°C durchgeführt.

### 3.3.3 Fällung von DNA

In dem für die Ligation verwendeten Puffer sind verschiedene Salze enthalten, die bei einer Elektroporation der Bakterien zu einem Kurzschluss führen können. Aus diesem Grund wurde die Ligation gefällt, gereinigt und anschließend in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Fällung liegt folgender Ansatz zu Grunde:

Fällungsansatz:	20 µl Ligationsansatz
	30 µl H <sub>2</sub> O (bidest.)
	5 µl 3M Natrium-Acetat
	125 µl Ethanol (96 %, kalt)

Die DNA wurde mindestens eine halbe Stunde bei -20°C gefällt und ebenso lange mit 12 000 g bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet in 500 µl 70 %igem eiskalten Ethanol zweimal gewaschen, bei 37°C getrocknet und zum Schluss in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.3.4 Transformation in *E. coli*

Die nach der Fällung gereinigte Ligation wurde zur weiteren Vermehrung der Plasmide in *E. coli*-Bakterien transformiert. Dazu wurden 5 µl der Ligation mit 50 µl Bakterien gemischt und anschließend durch Elektroporation in die Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden zur Erholung in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator (200 rpm) kultiviert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 200 µl auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.5 Isolation von Plasmiden aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA ermöglicht die weitere Verwendung des enthaltenen Inserts zur Sequenzierung als auch für weitere Klonierungen in andere Vektoren. Für die Isolation von Plasmiden aus Bakterien sind mehrere Präparationskits entwickelt worden, die je nach Menge der eingesetzten Bakterienkultur und der isolierten DNA als Mini-, Midi-, Mega- oder Giga-Präparationskit bezeichnet werden. Diese Kits sind aufgezeichnet unter Kapitel 2.1.

### 3.3.6 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung wurde in dieser Arbeit die Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) verwendet. Dazu wird das ALF-Express<sup>TM</sup>-System sowie das „Thermosequenase Kit mit 7deaza-GTP“ von Amersham verwendet.

Ansatz für den Mastermix:

2 µl CY5-markierter Primer (2pmol)  
10 µl DNA (1-5 µg)

Sequenzier-Ansatz: 1 µl dATP, dCTP, dGTP oder dTTP (jeweils in ein eigenes PCR-Reaktionsgefäß)

3 µl des Mastermixes pro PCR-Reaktionsgefäß

Reaktionsstop: 3 µl Stopmix

Die Reaktionen wurden im Thermocycler PTC-100™ (MJ Research Inc.) durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

	1 min.	95°C (Denaturierung)
25 Zyklen:	30 sec	95°C (Denaturierung)
	30 sec	60°C (Hybridisierung)
	1 min	72°C (Elongation)
abschließend:	3 min	72°C

Nach Zugabe des Formamid-haltigen Stopmixes wurde nochmals 2 min bei 95°C denaturiert. Diese Reaktionen wurden nach den Nukleotiden A, C, G und T getrennt in einzelne Taschen auf ein Acrylamid-Gel geladen.

Acrylamid-Gel

60 ml Hydrolink  
300 µl 10 % APS  
60 µl TEMED

Hydrolink

6 M Harnstoff  
5,5 % Long Ranger (Biozym)  
1,5 x TBE

10 x TBE-Puffer pH 8,5

90 mM Tris/Borat  
2mM EDTA

Laufpuffer

0,5 x TBE

## 3.4 DNA – Präparation und Analyse

### 3.4.1 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Extraktion der genomischen DNA (gDNA) aus der *A. thaliana* wurde 2x CTAB-Extraktionspuffer verwendet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Blätter in flüssigen Stickstoff zerkleinern (mit Mörser oder Stahlkugeln, in 50 ml Reaktionsgefäßen)
- pro g Blattmaterial 50 ml 2x CTAB-Extraktionspuffer zufügen
- 1 Stunde bei 68°C im Wasserbad inkubieren
- 1/2 Stunde bei 12 000 g zentrifugieren
- Überstand in neue Reaktionsgefäße überführen
- 1 µl RNase A (1 µg/µl) zugeben
- 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- Zugabe der gleichen Menge Chloroform
- vorsichtig mischen
- 10 min bei 12 000 g zentrifugieren
- wässrige Phase in ein Corexröhrchen überführen
- Zugabe des 2-3 fachen Volumens an 96 % Ethanol (4°C)
- Fällung der DNA bei –20°C für eine halbe Stunde
- 30 min bei 12 000 g bei 4°C zentrifugieren
- 2x mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet bei 37°C trocknen
- Aufnahme in 1 x TE oder H<sub>2</sub>O

Zur Kontrolle der Menge und Reinheit der isolierten DNA wird diese auf einem 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt und mit Kontroll-DNA bekannter Konzentration optisch verglichen.

2x CTAB-Extraktionspuffer

2 %	CTAB (N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid)
1,4 M	NaCl
1 %	PVP 40 000 MG (Polyvinylpyrrolidon)
100 mM	Tris/HCl pH 8
20 mM	EDTA pH 8

### 3.4.2 Reinigung der isolierten gDNA

Da in der durch die CTAB-Methode isolierten gDNA noch RNA und Proteine enthalten waren, wurde die DNA weiter über einen Cäsium-Chlorid-Gradienten aufgereinigt. Die derart gereinigte DNA lässt sich in genomischen Southern-Analysen weiter verwenden.

- zu isolierter gDNA in 1 ml 1x TE werden 3g CsCl in einem geeigneten Reaktionsgefäß zugeben und auf 3 ml mit 1x TE aufgefüllt (entspricht einer Endkonzentration des CsCl von 6M)
- sehr vorsichtig das CsCl lösen (nicht schütteln!)
- Zugabe von 20 µl Ethidium-Bromid (0,1 mg/ml)
- Überführung der Lösung in Zentrifugenröhrchen (sehr vorsichtig!)
- bis 2 mm unter den Rand mit 100 % Glycerin überschichten
- auf 0,01 g genaues Austarieren der Zentrifugenröhrchen
- Ultrazentrifugation: unter Vakuum für 48 Stunden bei 40 000 g und 20°C  
=> entstehen eines CsCl-Gradienten, der die DNA von den anderen Bestandteilen trennt
- Ethidium-Bromid-gefärbte Bande der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Reinigen der Ethidium-Bromid-behafteten DNA mit wassergesättigtem Butanol (Butanolextraktion) bis der wässrige Überstand mit der DNA keine rosa Färbung mehr aufweist
- wässrigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Fällung der DNA mit 96 % eiskalten Ethanol
- zweimal mit 70 % eiskalten Ethanol waschen
- Trocknen des Pellets und Aufnahme in 100 µl 1 x TE

### 3.4.3 Southern-Analyse von genomischer DNA

Die durch den CsCl-Gradienten gereinigte gDNA wurde für eine genomische Southern-Analyse eingesetzt. Diese ermöglicht den Nachweise von auf Nylon-Membran fixierten DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde. Dieser Ansatz wurde zur Bestimmung der Anzahl verwandter Gene im Genom oder die der möglichen Insertionen von T-DNA oder Transposon eingesetzt.

Reaktionsansatz des Verdau:

5 µg DNA (5-10 µg)  
4 µl Enzym (10 U/µl)  
20 µl 10 x Puffer  
ad 200 µl H<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Enzym wurde erneut zugegeben, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die gesamte DNA vollständig verdaut wurde, und der Ansatz weitere vier Stunden inkubiert.

Die verdaute DNA wurde anschließend gefällt und in 20 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Ladepuffer aufgenommen und in einem 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt (1 V/cm, über Nacht). Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert, um die Lauflänge der verwendeten Größen-Marker bestimmen zu können.

Für den DNA-Transfer auf Nylonmembranen (Hybond N) wurde das Gel in mehreren Schritten präpariert:

- Agarose-Gel zurechtschneiden und mit der Oberseite nach unten auf einer festen Unterlage in eine Schale transferieren
- Zugabe von 0,25 M HCl
- 15 min schütteln (Depurinisieren der DNA)
- Lösung entfernen und Gel mit H<sub>2</sub>O waschen
- Zugabe von 0,5 M NaOH
- 30 min schütteln (Denaturieren der DNA)
- Lösung entfernen und Gel mit H<sub>2</sub>O waschen
- Zugabe von einer Lösung mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl
- 30 min schütteln
- Lösung entfernen und Gel mit H<sub>2</sub>O waschen

- Zugabe einer Lösung mit 3 M NaCl und 1 M Tris/HCl pH 6,5
- 15 min schütteln
- Lösung entfernen (nicht waschen!)

Derart behandelte Gele wurden nun auf eine Lage Whatman-Papier transferiert und die Nylonmembrane vorsichtig auf das Gel gelegt, damit keine Luftblasen entstanden. Auf diese wurden mehrere Schichten Whatman-Papier (2-3 cm) und Löschpapier (4-5 cm) gegeben, um den Transferpuffer aus dem Puffer-Vorratsbehälter durch die entstehende Kapillarwirkung nach oben zu ziehen und dabei die DNA aus dem Gel an die Membrane zu bringen. Als Transferpuffer fungierte 20 x SSC. Zur Fixierung der DNA an die Membran wurde die Membran entweder unter UV-Licht behandelt oder zwei Stunden bei 72°C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran für die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wurde diese in 30 ml Prähybridisierungspuffer mit 500 µl einzelsträngige DNA (ssDNA, 10 mg/ml) vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurde die Gensonde mit Hilfe des "Random Prime Labeling Mix" radioaktiv markiert und zu 10 ml Hybridisierungslösung (mit 500 µl ssDNA) zugegeben. Um eine möglichst spezifische Hybridisierung zu erreichen, wurden sowohl die Vor- als auch die Hybridisierung bei 65°C durchgeführt. Die Membrane wurde anschließend gewaschen, um die unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Dazu wurden die Membrane jeweils 15 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bis 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Das Ergebnis wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Prähybridisierungslösung

0,3 g Dextransulfat  
 6 ml 20 x SETS-Puffer  
 3 ml 100 x Denhardts- Lösung  
 0,3 ml 10 % SDS  
 ad 30 ml H<sub>2</sub>O

Hybridisierungslösung

1 g Dextransulfat  
 2 ml 20 SETS- Puffer  
 1 ml 100 x Denhardts-Lösung  
 0,1 ml 10 % SDS  
 ad 10 ml H<sub>2</sub>O

### 3.5 RNA – Präparation und Analyse

#### 3.5.1 Isolation der RNA

Zur Präparation der RNA aus *A. thaliana* müssen sowohl die Lösungen als auch die Geräte RNase-frei sein, was durch Zugabe von 200 µl DEPC/l Flüssigkeit und zweimaligen Autoklavieren der Lösungen bzw durch 5 Stunden Inkubation bei 170°C der Geräte erreicht wird. Für die Präparation von RNA wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff fein mörsern und in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 1 ml Trifast (PeqLab)
- Lösung gut durchmischen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zugabe von 100 µl Chloroform
- sanft schütteln und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 5 min bei 4°C und 12 000 g zentrifugieren
- wässriger Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe des gleichen Volumens von Phenol:Chloroform (1:1)
- 5 min bei 4°C und 12 000 g zentrifugieren
- wässriger Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 250 µl Isopropanol
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 min bei 4°C und 12 000 g zentrifugieren
- Überstand entfernen

- Pellet zweimal mit 1 ml 70 % kalten Ethanol waschen
- Pellet trocken und in einer adäquaten Menge H<sub>2</sub>O aufnehmen

Zur Kontrolle wurde die RNA nach 2 min. Denaturierung bei 80°C auf einem 1,5 % Agarose-Gel aufgetrennt und photographisch dokumentiert.

### **3.5.2 Northern-Analyse**

Zur Bestimmung der Menge von mRNA eines bestimmten Genes in verschiedenen Geweben oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen wurde die Northern-Analyse angewandt. Dazu wurde die RNA auf eine Nylonmembrane transferiert und mit Hilfe von radioaktiv markierten Gensonden hybridisiert.

Für die Northern-Analyse wurden 1-5 µg RNA mit dem doppelten Volumen an Ladepuffer gemischt, bei 80°C zwei Minuten denaturiert, auf ein RNA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach der photographischen Kontrolle ohne weitere Vorbehandlung umgedreht auf ein Whatman-Papier transferiert. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>) gelegt sowie mehrere Schichten Whatman-Papier (2-3 cm) und Löschpapier (4-5 cm). Die entstehende Kapillarwirkung bewirkt einen Zug des Transferpuffers bestehend aus 10 x SSC, der die RNA auf die Nylonmembran transferiert. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran zweimal mit UV-Licht behandelt. Diese Membran wurde nun mit einer radioaktiv-markierten Gensonde hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung wurde durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen dokumentiert.

RNA-Ladepuffer

2,5 ml	Formamid
875 µl	37 % Formaldehyd
500 µl	10 x MOPS
1 ml	Glycerol
12,5 µl	EDTA
25 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
5 mg	Xylencyanol
5 mg	Brom-Phenolblau

RNA-Gel

1 g	Agarose
87,5 ml	H <sub>2</sub> O
	aufkochen
10 ml	10 x MOPS
2,5 ml	Formaldehyd

RNA-Laufpuffer (10x MOPS)

800 ml	H <sub>2</sub> O
41,8 g	MOPS
16,6 ml	3 M Natrium- acetat pH 5,2
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0

verwendet wird 1 x MOPS in  
frischem bidestillierten H<sub>2</sub>O.

### 3.5.3 Reverse Transkription

Eine weitere Möglichkeit die Menge an vorhandener RNA sichtbar zu machen und zu quantifizieren, ist die des Nachweises durch reverse Transkription und sich daran anschließender RT-PCR, die schon in Kapitel 2.3.1 dargestellt worden ist. Ebenfalls nach einer reversen Transkription lässt sich an der daraus entstandenen cDNA durch PCR die cDNA gesuchter Gene isolieren.

Reaktionsmix der Reversen Transkription:

- 0,5 µl T17-Primer
- 2,5 µl dNTP (10 mM)
- 10 µl 5x Puffer (Invitrogen)
- 5 µl DTT (0,1 M)
- 0,5 µl RNasin (10U/µl, Promega)
- 1 µl Superscript II (200 U/µl, Reverse Transkriptase,  
Invitrogen)
- ca 1200 ng RNA
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Das Binden der Primer an die RNA fand für 10 min bei Raumtemperatur statt, bevor die reverse Transkription bei 42°C für eine Stunde erfolgte.

## 3.6 Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen

### 3.6.1 Grundlagen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systemes

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ermöglicht den Nachweis von Interaktion zweier Proteine. Hierfür werden zwei Vektoren benötigt, von denen einer eine sogenannte Bindungsdomäne der andere eine Aktivierungsdomäne besitzt. Diese beiden Domänen stellen Teilfragmente eines Transkriptionsfaktors dar. An diese beiden Domänen wird jeweils die codierende Region eines Genes fusioniert. Nach Transformation in Hefe werden die jeweiligen Fusionsproteine exprimiert. Durch Interaktion der Fusionsproteine kommen Bindungs- und Aktivierungsdomäne in eine räumliche Nähe und binden an die Promotoren bestimmter Reportergene. Diese Reportergene können zum Beispiel die  $\beta$ -Galaktosidase oder ein Gen für die Histidin-Biosynthese sein. Auf diese Weise findet der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion statt. Diese Methode wird sowohl in einem Hefe-Zwei-Hybrid-„Screen“ („yeast two-hybrid screen“) verwendet oder um die Interaktionsstärke von Proteinen zu bestimmen. Bei dem Hefe-Zwei-Hybrid-„Screen“ wird die cDNA eines Genes für das Protein, dessen Interaktionspartner gesucht wird, als „Köder“ in den Bindungsdomänenvektor eingesetzt, während eine cDNA-Bank in Aktivierungsdomänenvektoren kloniert wurde. Durch Aktivierung des Reportergenes für die Histidin-Biosynthese wachsen nur solche Hefen auf Histidin-freiem Selektionsmedium, in denen eine Protein-Protein-Interaktion stattfindet. Der Aktivierungsdomänenvektor kann dann aus der Hefe präpariert und nach einer Sequenzanalyse das entsprechende Gen des interagierenden Proteins identifiziert werden. Der zweite Ansatz des Hefe-Zwei-Hybrid-Systemes ist der der Messung der Interaktionsstärke. Dabei werden die Gene zweier bestimmter Proteine in die beiden Vektoren kloniert, in Hefe transformiert und deren Interaktionsstärke entweder durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität oder durch Wachstum auf Histidin-freiem Selektionsmedium bestimmt. Diese Methode kann auch dazu angewandt werden, um Bindungsdomänen zu identifizieren (Bartel und Fields, 1997; Grossel *et al.*, 1999).

### 3.6.2 Transformation von Hefen

Für die Transformation von Hefen wurden diese am Vortrag auf festem Medium ausgestrichen. Die Transformation wurde folgendermaßen durchgeführt:

- mit einer Impf-Öse werden die Hefen von der Medienplatte genommen und in 1 ml YPD-Medium resuspendiert
- Hefen 1 min bei 7 000 g zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Zugabe des Transformationsansatzes
- Hefen darin resuspendieren
- Inkubation der Hefen 1 Stunde bei 30°C
- Hitzeschock der Hefen 20 min bei 42°C
- 5 min im Eisbad inkubieren
- Hefen 1 min bei 7 000 g zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Hefen in 1 ml Selektionsmedium resuspendieren

Von diesem Ansatz wurden 200 µl auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

Transformationsansatz:

- 240 µl 50 % PEG 3350 (Polyethylenglycol)
- 36 µl 1M Lithium-Acetat
- 19 µl H<sub>2</sub>O
- 50 µl ssDNA (1 µg/µl)
- 5 µl zu transformierendes Plasmid (1 bis 5 µg; bis zu zwei Plasmide)

### 3.6.3 Protein-Protein-Interaktionsassays

Die in dieser Arbeit durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen wurden mit den Hefe-Stämmen SMY3 und PJ69-4A durchgeführt. Als Vektoren wurden der Vektor pGBT9.BS als Bindungsdomänenvektor und pGAD.GH als Aktivierungsdomänenvektor eingesetzt (vergl. Tab. 1). Für eine Bestimmung der Interaktionsstärke auf Selektionsmedien wurde der Hefe-Stamm SMY3 eingesetzt, während für die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Hefe-Stamm PJ69-4A besser geeignet war.

#### 3.6.3.1 Selektion auf Minimal-Medien

Die nach einer Transformation auf LT-Medium gewachsenen Hefe-Kolonien enthielten nun beide Vektoren, sowohl den Bindungs- als auch den Aktivierungsdomänenvektor. Für den Nachweis einer Interaktion zwischen den auf den Plasmiden kodierten Proteine, wurden die Hefen auf Histidin-freiem Medium selektiert (bei SMY3-Hefen auf SD-LTH mit 25 mM 3AT, 3-Amino-Triazol). Ein Wachstum auf diesem Medium deutete auf eine Interaktion. Als Kontrolle wurden Hefen derselben Hefekolonie auf Medien für Selektion auf die Anwesenheit der Vektoren ausgestrichen (SD-LT, ohne Leucin und Tryptophan).

Zur Kontrolle der Interaktionsstärke zweier Proteine wurde der Tropftest mit einer Verdünnungsreihe angewendet. Bei diesem Tropftest wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Hefen in einer 4 ml-Flüssigkultur in LT-Medium über Nacht wachsen lassen
- 2 ml der Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen
- 500  $\mu$ l der Kultur in eine Küvette mit 500  $\mu$ l Medium oder H<sub>2</sub>O geben und mischen
- Dichte der Kultur bei OD<sub>600</sub> messen (aufschreiben!)
- die Kultur im 2 ml Reaktionsgefäß bei 7 000 g 1 min zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Hefen in soviel  $\mu$ l LTH-Flüssigmedium aufnehmen, wie der bei der OD-Messung erhaltenen Extinktion entsprechen (Beispiel: OD<sub>600</sub> lag bei 0,976, dann wurden die Hefen in 976  $\mu$ l Medium aufgenommen), auf diese Weise wurde die Kultur genau auf eine OD<sub>600</sub> von 2,0 eingestellt

- Verdünnungsreihe von je 1:10 für vier weitere Verdünnungen herstellen
- Oberfläche der Selektionsplatten (SD-LT und SD-LTH + 25 mM 3AT) trocknen lassen
- je 10 µl jeder Verdünnung in einer Reihe mit senkrecht gehaltener Pipette tropfen (jeweils auf beide Selektionsplatten)
- Kultur langsam eintrocknen lassen
- Hefen eine Woche bei 30°C wachsen lassen

Das Wachstum der Hefen in den verschiedenen Verdünnungen auf der Histidin-freien Selektionsplatte erlaubte eine relative Abschätzung der Stärke der Protein-Protein-Interaktion. Bei einer starken Interaktion der beiden Proteine war selbst bei einer Verdünnung von 1:10<sup>4</sup> ein Wachstum erkennbar, während bei einer schwachen Interaktion Wachstum nur bei den Verdünnungen 1:1 und eventuell noch 1:10 nachweisbar waren.

#### 3.6.3.2 Colorimetrische Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (oNPG-Test)

Eine Quantifizierung der Interaktionsstärke der Protein-Protein-Interaktion lässt sich weiterhin mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidase des Hefe-Zwei-Hybrid-Systemes untersuchen. Dabei wurde deren Aktivität durch Spaltung von o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid und dem damit einhergehenden Farbumschlag von farblos in gelb colorimetrisch bestimmt. Dieser als oNPG-Test bezeichnete Assay wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 4 ml Übernachtskultur von Hefen (3 unabhängige Kolonien pro Ansatz) anwachsen lassen ( $OD_{600} > 1,0$ )
- $OD_{600}$  der Kulturen messen
- 2 ml dieser Kultur in 2 ml Reaktionsgefäße überführen
- 1 min bei 7 000 g zentrifugieren
- Überstand entfernen und Hefen mind. eine halbe Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  einfrieren, wobei die Zellstrukturen zerstört werden
- Pellet in 665 µl H-Puffer, 55 µl Chloroform und 55 µl 0,1 % SDS resuspendieren (als Kontrolle zwei Ansätze ohne Hefen verwenden)
- 10 min gut schütteln

- 
- 125 µl oNPG-Lösung (4 mg/ml) zugeben
  - Ansätze bei 30°C Wasserbad inkubieren bis leichte Gelbfärbung zu erkennen ist  
(Reaktionszeit messen!)
  - Zugabe von 400 µl 1 M NaOH zum Stoppen der Reaktion
  - 1 min bei 7 000 g zentrifugieren
  - Überstand in Küvetten überführen und die Lösung bei OD<sub>420</sub> messen, die beiden Ansätze ohne Hefe werden dabei zur Ermittlung des Nullwertes eingesetzt

Die β-Galaktosidase-Aktivität wird mit folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Aktivität} = (1000 \times \text{OD}_{420}) : (2_{\text{ml}} \times \text{Reaktionszeit} \times \text{OD}_{600})$$

#### H-Puffer

100 mM HEPES/KOH pH 7,0

150 mM NaCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

1 % (w/v) BSA

## **3.7 Pflanzentransformation**

### **3.7.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

Voraussetzung für die Transformation von Pflanzen ist die Einführung des Plasmides in Agrobakterien. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation bei 2,5 µF und 2,5 kV. Die Bakterien wurden anschließend für vier Stunden in 1 ml YEB-Medium bei 28°C kultiviert. Von diesem transformierten Ansatz wurden 10–50 µl auf YEB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 28°C mehrere Tage inkubiert.

### 3.7.2 Transiente Pflanzentransformation

Die transiente Transformation kann sowohl für Reporter-gen-Fusionsproteine wie z.B. GFP-Fusionsproteine, als auch zur Extraktion von überexprimierten Proteinen verwendet werden. Dafür wurden Blätter von *A. thaliana* verwendet. Die Agrobakterien wurden in einer 10 ml Übernachtskultur hochgezogen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 5 000 g wurde das Bakterien-Pellet in 10 ml Induktionsmedium aufgenommen und für 0,5-4 Stunden kultiviert. Diese Kultur wurde nun mit Hilfe einer 1 ml- Spritze ohne Injektionsnadel auf der abaxialen Seite des Blattes unter Gegendruck des Fingers auf der Gegenseite in das Blatt gespritzt. Nach 5-24 Stunden wurde die Transformation ausgewertet.

<u>Induktionsmedium</u>	<u>AB-Mix</u>
50,78 mM MES	373,9 mM NH <sub>4</sub> Cl
0,5 % Glucose (w/v)	24,34 mM MgSO <sub>4</sub>
1,734 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40,23 mM KCl
0,2 mM Acetosyringone	1,36 mM CaCl <sub>2</sub>
5% (v/v) 20 x AB-Mix	0,18 mM FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O

### 3.7.3 Stabile Pflanzentransformation

Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde die Vakuum-Infiltrationsmethode eingesetzt (Bechtold und Pelletier, 1998). Dazu wurden die Agrobakterien zuerst in einer Vorkultur von 10 ml über Nacht angezogen, bevor eine Hauptkultur von 1 l YEB-Medium angeimpft und einen weiteren Tag kultiviert wurde. Diese Hauptkultur wurde abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet im Infiltrationsmedium resuspendiert. Die zu transformierenden Pflanzen sollten möglichst viele Knospen und Blüten aufweisen, um eine effiziente Transformation zu erreichen. Dazu wurden die Pflanzen kopfüber in die Bakterien-Suspension getaucht und in einem Eksikator für 10 min unter Vakuum gesetzt. Nach einer Trocknungsphase von zwei Tagen wurden die Pflanzen eingetütet.

#### Infiltrationsmedium

1 x Murashige & Skoog-Medium  
50 g Saccharose  
0,25 g MES  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
mit KOH auf pH 5,7 einstellen  
nach Abkühlung auf 37-40°C Zugabe von  
10 µl BAP  
200 µl Silwet

### **3.7.4 Selektion transgener Pflanzen**

Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte in Abhängigkeit der vermittelten Resistenz des verwendeten Vektors. Sind die Pflanzen durch das Herbizid BASTA zu selektieren, wurden diese auf Erde ausgesät und vernalisiert. Die etwa zwei Wochen alten Keimlinge wurden mit einer BASTA-Lösung (1:1000 mit 0,1 % Tween 20) besprüht. Nicht-transformierte Pflanzen starben spätestens nach der zweiten Behandlung ab. Bei einer Selektion der Pflanzen durch Kanamycin oder Hygromycin wurden die Samen zuerst sterilisiert, bevor sie auf entsprechende Antibiotika-haltigen MS-Platten ausgelegt wurden. Die selektierten Pflanzen wurden nach drei Wochen auf Erde umgesetzt.

Die Samensterilisation wurde wie folgt durchgeführt:

- Samen in einem Reaktionsgefäß mit 70 % Ethanol etwa 1/2 Stunde waschen
- Samen setzen lassen und Ethanol entfernen
- Zugabe von wenig Natrium-Hypochlorid (0,1-1 ml)
- schütteln und Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit sterilem Wasser
- 10 min schütteln
- Wasser entfernen und noch einmal mit Wasser waschen
- Samen in 0,2 % Agar aufnehmen und auf Selektionsplatten ausplattieren
- zwei Tage bei 4°C vernalisieren und anschliessend unter Langtagsbedingungen wachsen lassen

### 3.8 Isolierung von T-DNA-Insertionsmutanten

Die Isolation und Charakterisierung von Funktionsverlust-Mutanten ermöglicht die *in vivo*-Funktionsaufklärung des betroffenen Genproduktes. In *A thaliana* wird die T-DNA-vermittelte Insertionsmutagenese für diese revers-genetische Funktionsanalyse eingesetzt. In den letzten Jahren sind Tausende durch T-DNA oder Transposon-Insertionen hervorgerufene Mutantenlinien in verschiedenen Laboren hergestellt worden, die zu kompletten Ausfall von Proteinen führen können. Diese Mutantenlinien wurden teilweise öffentlich zugänglich gemacht.

Die Insertion einer T-DNA oder eines Transposons erfolgt zufällig im Genom. Dies ermöglicht mit einer durchgeführten Transformation einiger Pflanzen die Herstellung vieler unterschiedlicher Linien. Um herauszufinden, ob sich nun eine solche Insertion im gesuchten Gen befindet, wurden an der aus diesen Pflanzen isolierten DNA PCRs durchgeführt. Um die Arbeit einzuschränken, wurde die DNA, die aus zwanzig Einzelpflanzen isoliert wurde, in sogenannten 20er DNA-Pools vereinigt, fünf dieser 20er DNA-Pools wurden zu 100er DNA-Pools zusammengefasst und diese wiederum in 1000er DNA-Pools (vergl. Abb. 1). Für die Durchsuchung mit Hilfe der PCR von derart hergestellten 1000er DNA-Pools werden Primer, die entweder an die rechte oder die linke Insertionsregion der T-DNA binden („right border“ und „left border“), als auch zwei genspezifische Primer verwendet. Da der Einbau der T-DNA nicht gerichtet im Genom verläuft, kann die Insertion auch in umgekehrter Orientierung erfolgen. Aus diesem Grund wurden alle vier möglichen Primerkombinationen LB/A1, LB/S1, RB/A1 und RB/S1 verwendet. Nach Durchführung der PCR wurden die Reaktionen in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten genspezifischen Sonde hybridisiert. Die auf dem exponierten Film als positiv identifizierten PCR-Produkte konnten den entsprechenden 1000er DNA-Pools zugeordnet werden. An den diesem 1000er DNA-Pool zugeordneten 100er DNA-Pools wurden wiederum PCRs mit der entsprechenden Primer-Kombination durchgeführt, mit der ein positives PCR-Produkt erhalten wurde. Entsprechend wurde an den 20er DNA-Pools des positiven 100er DNA-Pools verfahren. Um die Einzelpflanze mit der gesuchten Insertion zu isolieren, wurden etwa 400 Samen der Pflanzen aus dem positiven 20er Pool ausgesät. Auch die aus diesen Pflanzen isolierte DNA wurde in kleine Gruppen zusammengefasst, um den Aufwand an PCRs

zu reduzieren. Durch die Einteilung der Pflanzen in Reihen und Spalten konnten die Einzelpflanzen mit den entsprechenden Insertionen identifiziert werden. Da die Kenntnis der genauen Lage der Insertion ebenfalls wichtig ist, wurde das in den PCRs mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primern erhaltene Produkt in einen mit Xcm I geschnittenen Vektor ligiert, in *E. coli* transformiert und die klonierte Insertion sequenziert.

Auf diese Weise wurden 36 500 T-DNA-Insertions-Linien durchsucht, die in folgenden Laboren generiert wurden: Feldmann (9 500 Linien), Tom Jack (11 000 Linien), INRA (8 000 Linien) und Weigel (8 000 Linien). Da die DNA-Pools in Ulm nicht zur Verfügung standen, wurden die PCRs an den 1000er DNA-Pools im Max-Delbrück-Laboratorium am Max-Planck-Institut in Köln im Labor von Burkhard Schulz durchgeführt.

Eine andere, neuere Methode eine Mutante zu identifizieren, ist inzwischen die Durchsuchung von Datenbanken mit verschiedene Listen, in denen flankierende Sequenzen solcher Insertionen von Einzelpflanzen veröffentlicht wurden. Aus einer derartigen Liste der sogenannten Sundaesan-Linien (Parinov *et al.*, 1999) wurde ebenfalls eine in dieser Arbeit untersuchte Mutante identifiziert und die Einzelpflanze durch PCR isoliert.

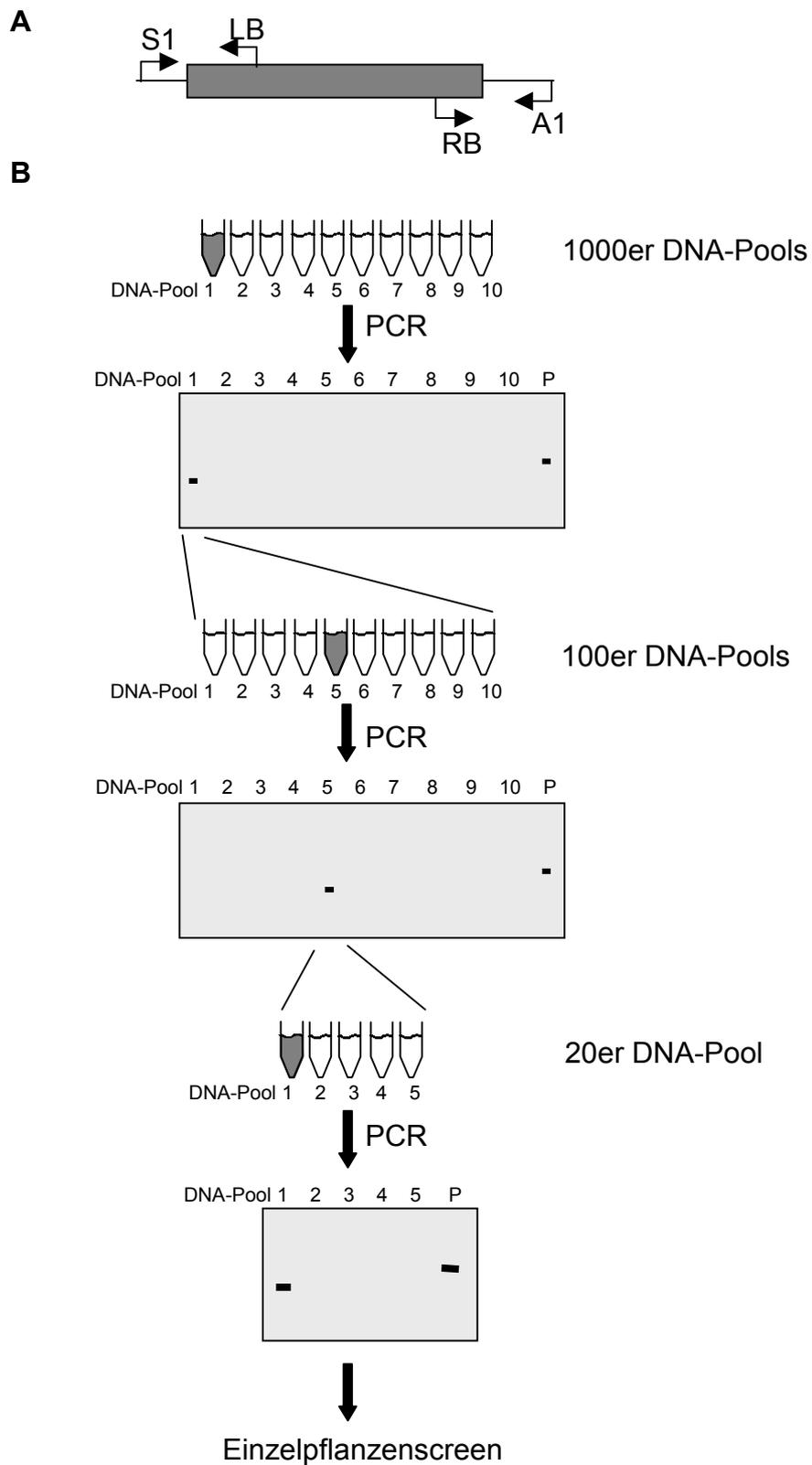


Abb. 1: Schema der T-DNA-Insertions-Mutanten-Isolierung mit Hilfe der PCR.

A) Darstellung der Positionen der Primer. B) Schema der T-DNA-Insertions-Mutanten-Isolierung.

### 3.9 Hypokotylen-Assay

Hormone und Osmolyte beeinflussen den Wuchs von Pflanzen. Auf der Suche nach phänotypischen Veränderung der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten wurde deshalb der Hormon-Hypokotylen-Assay und der Osmolyt-Hypokotylen-Assay angewendet. In diesem Ansatz wurden die Längen der Hypokotylen gemessen und mit den entsprechenden Messungen bei Wildtyp verglichen. Beiden Assays liegt derselbe Versuchsaufbau zugrunde (vergl. Abb. 2).

- in Gerda-Dosen werden vier Lagen von 8,5 x 8,5 cm grossem Dünnschicht-Chromatographie-Papier (Schleicher & Schuell) gelegt
- Zugabe von 9,5 ml H<sub>2</sub>O (eventuell mit verschiedenen Konzentrationen von Pflanzenhormonen)
- etwa 50 Samen gleichmässig darauf verteilen
- Vernalisation für 2 Tage bei 4°C
- Induktion der Keimung für 1 Tag unter Licht
- Keimen der Samen für 4 Tage in Dunkelheit
- Messen der Länge des Hypokotyls der Keimlinge zwischen Wurzelansatz und Kotyledonen (mind. 50 Keimlinge pro Ansatz)

Für den Hormon-Hypokotylen-Assay wurden folgende Hormone eingesetzt:

Methyljasmonsäure (Duchefa):

Stocklösung 1 mM

verwendete Konzentrationen: 0,1 bis 5 µM

2,4 Dichlorphenoxyacetische Säure (2,4 D; Duchefa):

Stocklösung 1 mM

verwendete Konzentrationen: 0,5 bis 2 µM

1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC; Sigma):

Stocklösung 100 mM

Verwendete Konzentrationen: 5 bis 20 µM

Kinetin (Duchefa): Stocklösung 4,64 mM

Verwendete Konzentrationen: 0,1 bis 5 µM

Für den Hypokotylen-Assay mit Osmolyten wird der Grundansatz derart verändert, dass die Keimung der Samen zuerst auf Wasser getränktem Dünnschicht-Chromatographiepapier erfolgt (Abb. 2B). Dies ist notwendig, da die Samen bei höheren Konzentrationen von Osmolyten nicht keimen. Erst nach der Induktion der Keimung unter Licht und anschließender Kultivierung für einen Tag im Dunkeln wurden die drei unteren Lagen des Dünnschicht-Chromatographiepapiers erneuert, diese mit 9 ml H<sub>2</sub>O und unterschiedlichen Konzentrationen von Osmolyten getränkt und die Papierschicht mit den Samen darauf gelegt. Nach weiteren drei Tagen wurden die Länge der Hypokotylen gemessen. Als Osmolyte wurden verwendet:

- NaCl: verwendete Konzentrationen: 50 bis 200 mM
- Mannitol: verwendete Konzentrationen: 100 bis 500 mM
- LiCl: verwendete Konzentrationen: 5 bis 30 mM
- KCl: verwendete Konzentrationen: 25 bis 150 mM

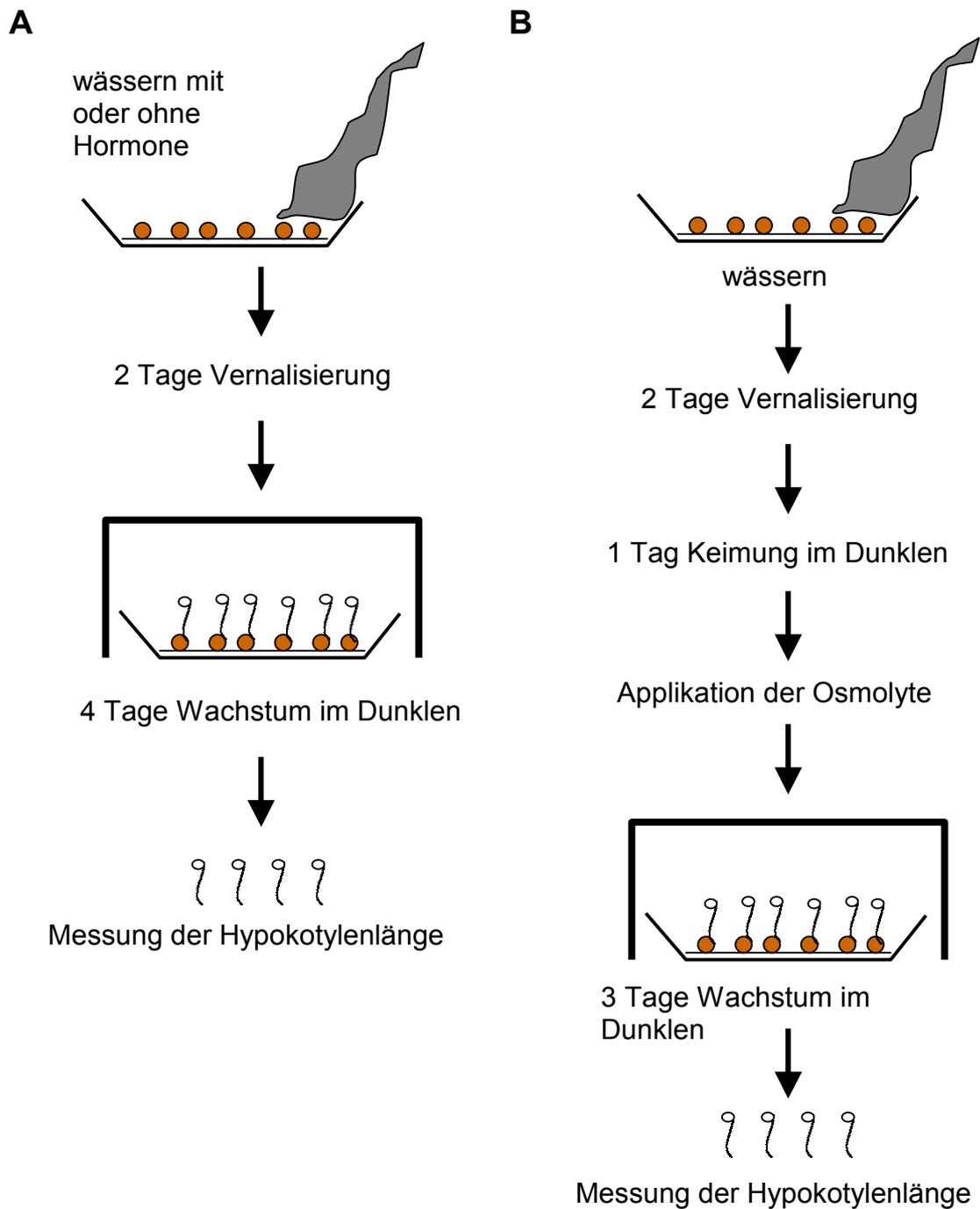


Abb. 2: Schemata der Hypokotylenassays.

A) Schema des Hormon-Hypokotylenassays. B) Schema des Osmolyt-Hypokotylen-Assays.

### 3.10 Verwendete Methoden zur Färbung von Pflanzenmaterial

Zum Nachweis der Expression der Glucuronidase unter Kontrolle von Promotoren bestimmter Gene wurden transgene Pflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten hergestellt und an diesen eine GUS-Färbung durchgeführt. Weitere Färbemethoden wurden eingesetzt, da in der *arr2*-Mutante Nekrosenbildung in den Blättern festgestellt wurde. Die Bildung dieser Nekrosen kann durch verschiedene Färbungen deutlich gemacht werden, wie etwa die Sichtbarmachung toter Zellen mit Hilfe von Lactophenol-Trypanblau, der Anwesenheit von Peroxiden durch DAB-Färbung oder die Kallosebildung durch Anillinblau-Färbung.

#### 3.10.1 GUS-Färbung

Die durch den Promotor beeinflusste Induktion des  $\beta$ -D-Glucuronidase-Genes kann durch Spaltung von x-GlcA (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid) an der  $\beta$ -Glucuron-Bindung durch dieses Enzym anhand des damit einhergehenden Farbumschlages in einen Blauton sichtbar gemacht werden. Damit kann in Pflanzen, die die Promotor-Reportergen-Fusion exprimieren, der Expressionsort sowohl eines bestimmten Genes in einer Pflanze nachgewiesen werden als auch die Bedingungen, unter denen die Expression erfolgt. Dazu wurde das Pflanzenmaterial in GUS-Puffer über Nacht bei 37°C inkubiert und mit 70 % Ethanol entfärbt.

##### GUS-Puffer

10 mg x-GlcA (Duchefa)

20  $\mu$ l DMSO

10  $\mu$ l Triton-X 100

ad 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0

### 3.10.2 Lactophenol-Trypanblau-Färbung

Durch die Färbung mit Lactophenol-Trypanblau werden tote Zellen sichtbar gemacht, da die Färbelösung nur die Zellwände nicht-intakter Zellen durchdringen kann (Koch und Slusarenko, 1990). Für diesen Nachweis wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Pflanzenmaterial in 70°C heiße Lactophenol-Trypanblau-Lösung einlegen
- 5 min Vakuum anlegen
- 2 min in sprudelndem Wasser kochen
- mit Chloralhydrat-Lösung entfärben, gegebenenfalls diese Lösung mehrere Mal wechseln
- mit 70 % Glycerol equilibrieren (mehrere Stunden)

#### Lactophenol-Trypanblau-Lösung

25 mg/ml Trypanblau  
 25 % Milchsäure (v/v)  
 23 % H<sub>2</sub>O-saturiertes Phenol (v/v)  
 25 % Glycerol (v/v)  
 H<sub>2</sub>O

#### Chloralhydrat-Lösung

25 g Chloralhydrat  
 10 ml H<sub>2</sub>O

### 3.10.3 Anillinblau-Färbung

Durch die Anillinblau-Färbung wird die Kallosebildung der Zellen unter Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht. Das Pflanzenmaterial wurde dazu mit 70 % Ethanol entfärbt und anschließend in der Anillinblau-Färbelösung für 5 bis 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit einer 67 mM Dikalium-Hydrogenphosphat-Lösung entfärbt. Die Probe konnte nun im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

---

### Anillinblau-Färbelösung

0,05 % Anillinblau (w/v)

67 mM Dikalium-Hydrogenphosphat pH 9,8

### **3.10.4 DAB-Färbung**

Bei der DAB-Färbung (DAB = Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) kommt es zu einem Farbumschlag bei Anwesenheit von Peroxiden. Hierfür wurde das Pflanzenmaterial in eine Entwicklerlösung gegeben und solange inkubiert, bis sich eine deutliche Färbung abzeichnete. Anschließend wurde das Blattmaterial mit 70 % Ethanol entfärbt.

### Entwicklerlösung

50 µl 2 M Tris/HCl pH 7,4

5 µl NiCl<sub>2</sub> (80 mg/ml)

10 µl DAB (40 mg/ml)

ad 1 ml H<sub>2</sub>O

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Molekulare Analyse von Kalzium-Sensoren und deren interagierenden Protein-Kinasen

Nach der Identifizierung und Isolierung des Kalzium-Sensors AtCBL1, einem der Calcineurin B-Untereinheit ähnlichen Protein (Calcineurin B like), und einer mit AtCBL1 durchgeführten Zwei-Hybrid-Analyse, wurde AtCIPK1 (CBL interagierende Protein-Kinase) als interagierendes Protein identifiziert (Kudla *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999).

#### 4.1.1 Analyse von AtCBL1 und AtCIPK1 in *Arabidopsis thaliana*

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifizierung der kodierenden Regionen der Gene von AtCBL1 und AtCIPK1. Die Funktion der Proteine, für die diese Gene kodieren, war dagegen unbekannt. Um die Funktionen dieser Proteine in der Pflanze analysieren zu können, wurde ein revers-genetischer Ansatz gewählt. Dieser basiert auf der Integration von T-DNA in codierende Bereiche des zu untersuchenden Genes. Der resultierende Funktionsverlust erlaubt die phänotypische Charakterisierung der Auswirkungen der Mutation.

##### 4.1.1.1 Identifizierung einer T-DNA-Mutante

Zur Funktionsanalyse von AtCBL1 und AtCIPK1 durch reverse Genetik mußten erst T-DNA-Insertionen in den codierenden Bereichen der beiden Gene nachgewiesen werden. Hierfür wurden in dieser Arbeit 36 000 unabhängige T-DNA-Insertionslinien mit Hilfe der PCR durchsucht. Auf diese Weise wurden in den Feldmann-Linien T-DNA-Insertionen in den codierenden Bereichen der Gene von AtCBL1 und AtCIPK1 identifiziert. Durch Klonierung der erhaltenen PCR-Fragmente in den Xcm-Vektor und anschließender Sequenzierung wurden die flankierenden Sequenzen auf beiden Seiten der T-DNA-Insertion genau analysiert. Die Insertion der T-DNA im CBL1-Gen liegt im ersten Intron der codierenden Region im 5'UTR 265 Basen vor dem

Startcodon (vergl. Abb. 3). Im Falle von CIPK1 liegt die Insertion der T-DNA im zweiten Intron in der codierenden Region 1373 Basen nach dem Startcodon.

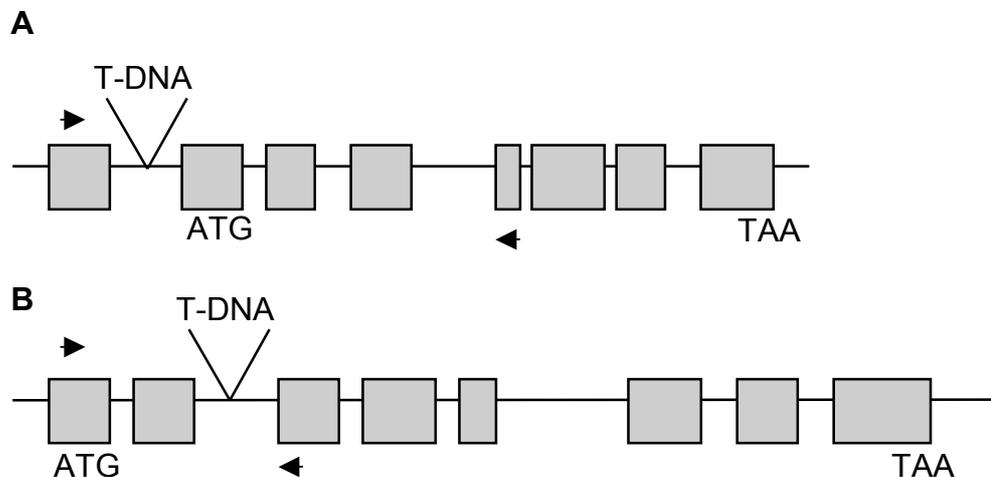


Abb. 3: Schematische Darstellung der Insertionsorte der T-DNA in den Genen von AtCBL1 und AtCIPK1. A) Position der Insertion der T-DNA im CBL1-Gen. B) Position der Insertion der T-DNA im CIPK1-Gen. Ebenfalls angegeben sind die Positionen der verwendeten Primer.

#### 4.1.1.2 Isolierung der cbl1- und cipk1-Mutanten

Nachdem die Insertion der T-DNA anhand der Sequenzierung sowohl im CBL1- als auch im CIPK1-Gen nachgewiesen werden konnte, wurden Einzelpflanzen mit den entsprechenden Insertionen isoliert. Diese isolierten T-DNA-Insertionsmutanten-Pflanzen von CBL1 und CIPK1 mußten nun daraufhin untersucht werden, ob es sich um homo- oder heterozygote Pflanzen bezüglich der T-DNA-Insertion handelt. Dazu wurde an aus diesen Pflanzen isolierter gDNA PCRs mit den Primerkombinationen der beiden genspezifischen Primer und des Primerpaares durchgeführt, mit dem die Insertion ermittelt wurde. Zur Analyse der cbl1-Mutanten wurden die Primerpaare CBL1-cDNA-F/CBL1-A1 und CBL1-A1/LB2 verwendet. Zur Untersuchung der cipk1-Mutante wurden die Primerpaare CIPK1-S1/CIPK1-A1 und CIPK1-A1/RB2 eingesetzt. Ein PCR-Produkt nach der Amplifikation mit den genspezifischen Primern würde ein Vorhandensein des Wildtyp-Allels des Genes nachweisen. Bei gleichzeitigem Erhalt eines PCR-Produktes mit dem Primerpaar Genprimer/T-DNA-Primer, würde nahe legen, dass es sich um eine heterozygote Pflanze bezüglich der Insertion handelt. Ist ein PCR-Produkt nur bei dem Primerpaar Genprimer/T-DNA-Primer zu erkennen, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine homozygote Pflanze bezüglich der Insertion. Bei Abwesenheit eines derartigen

Produktes hingegen ist es eine Wildtyp-Pflanze. Als Kontrolle wurde DNA aus der den Feldmann-Linien zugrunde liegende Ökotyp Wassilewska verwendet (vergl. die Beispiele in Abb. 4). Auf diese Weise wurden drei homozygote und vier heterozygote Pflanzen mit Insertionen im CBL1-Gen isoliert. Ebenso wurden drei homozygoten und drei heterozygote Pflanzen mit einer T-DNA-Insertion im CIPK1-Gen isoliert. Für die weiteren Untersuchungen und Experimente in dieser Arbeit wurden die aus diesen Pflanzen resultierenden Linien bei CBL1 die Linie cbl1-8C und bei CIPK1 die Linie cipk1-4D3 verwendet.

Die Transformation von Pflanzen führt häufig zur Integration von mehr als einer T-DNA an verschiedenen Stellen des Genoms. Um indes die Phänotypen einer Mutante auf das Mutationsereignis im untersuchten Gen zurückführen zu können, muss nachgewiesen werden, dass nur eine T-DNA-Insertion im Genom vorliegt. Um die Anzahl der Insertionen in den Einzelpflanzen der isolierten Mutanten von CBL1 und CIPK1 bestimmen zu können, wurden genomischen Southern-Analysen und der genetische Ansatz einer Kopplungsanalyse durchgeführt. Für die Southern-Analyse wurde die gDNA sowohl von dem Wildtyp als auch aus Pflanzen der Linien cbl1-8C und cipk1-4D3 isoliert, mit den Enzymen BamH I, EcoR I und Hind III verdaut, elektrophoretisch in einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Diese Membran wurde mit der jeweiligen Gensonde bzw. der entsprechenden T-DNA-Sonde (bei cbl1-8C mit H10/LB, bei cipk1-4D3 mit H23/RB) radioaktiv hybridisiert. Die dabei sich ergebenden Hybridisierungsmuster in Abb. 5 zeigen sowohl für cbl1-8C als auch für cipk1-4D3, dass beide Linien jeweils nur eine T-DNA-Insertion aufweisen sowie dass beide homozygote Mutanten-Linien darstellen.

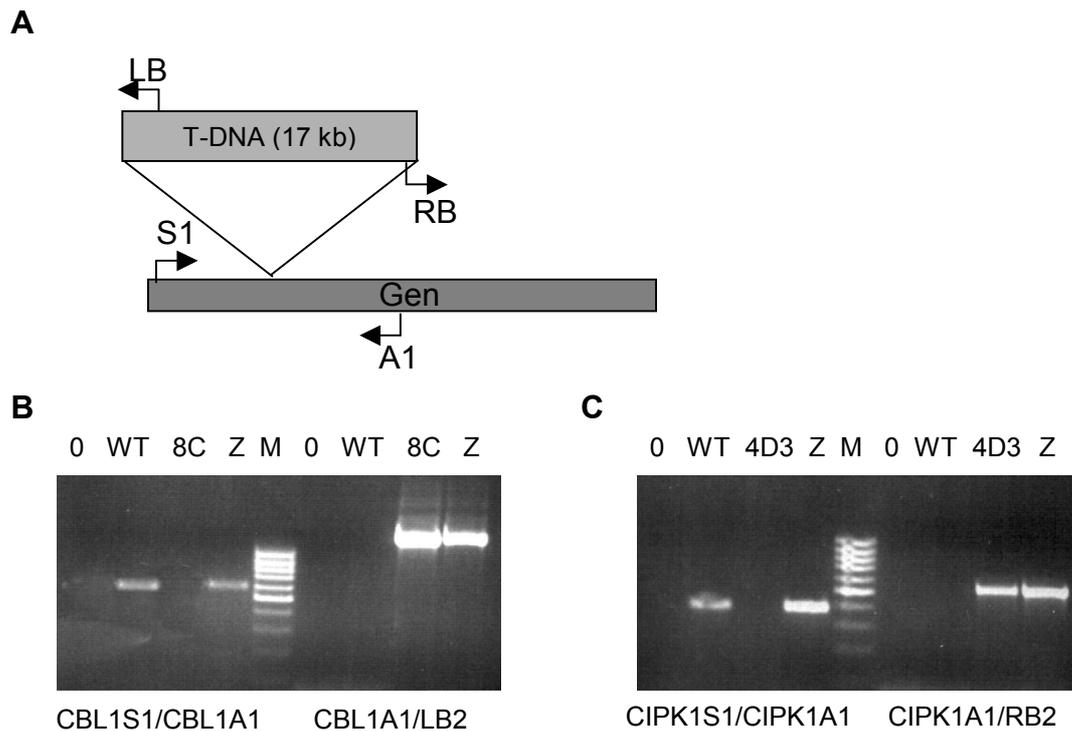


Abb. 4: PCR-Analyse der Mutantenlinien auf Homo- oder Heterozygotie in Bezug auf die T-DNA-Insertion. A) schematische Lage der für die PCR-Analyse verwendeten Primer im CBL1 bzw. CIPK1-Gen sowie in der T-DNA. B) PCR an genomischer DNA von WT und *cb1*-Mutanten zur Verifizierung der Insertion. Die *cb1*-8C-Pflanze weisen kein Wildtyp-Allel im CBL1-Gen aufgrund der T-DNA-Insertion auf und ist wahrscheinlich homozygot in Bezug auf die T-DNA-Insertion. C) PCR an genomischer DNA von WT und *cipk*-Mutanten zur Verifizierung der Insertion. Die Mutantenlinie *cipk1*-4D3 ist voraussichtlich homozygot in Bezug auf die T-DNA-Insertion. WT: Wassilewska; Z: heterozygote Linie; M: 100bp Marker.

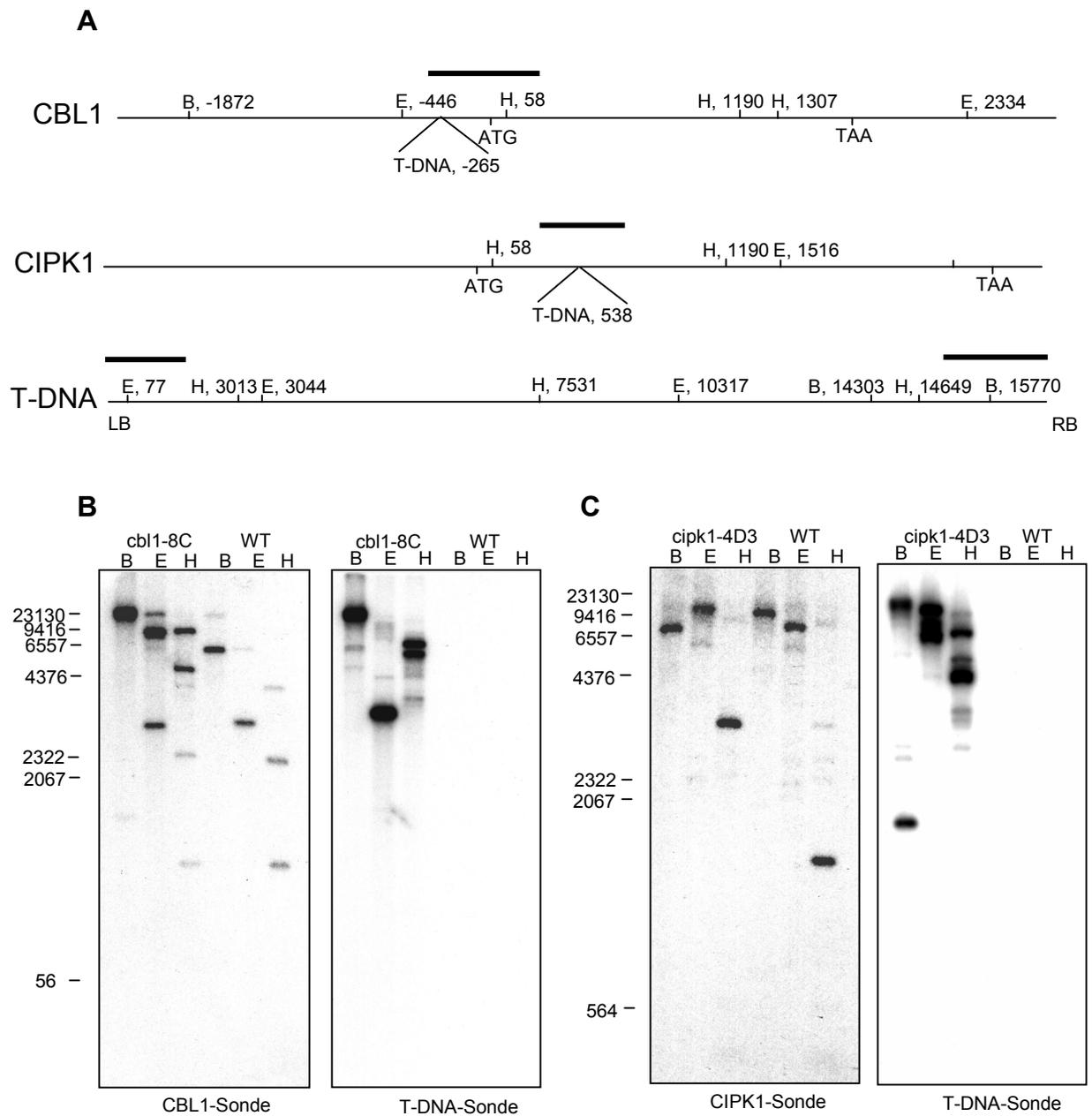


Abb. 5: Southern-Analyse der Mutantenlinien auf Homo- oder Heterozygotie in Bezug auf die T-DNA-Insertion sowie der Bestimmung der Anzahl der Insertionen. A) Schematische Darstellung der Schnittorte im genomischen Bereich um das CBL1-Gen, um das CIPK1-Gen sowie in der T-DNA sowie Positionen der verwendeten Sonden. Angegeben sind jeweils die Positionen der Schnittorte in Nukleotiden in Bezug auf das Startcodon ATG. B) Genomische Southern-Analyse an der *cb1-8C*-Mutante. C) Genomische Southern-Analyse an der *cipk1-4D3*-Mutante. Die Fragmentgrößen des Markers bei den Southern-Analysen sind jeweils in bp auf der linken Seite angegeben. Die Mutantenlinien *cb1-8C* und *cipk1-4D3* weisen jeweils nur eine T-DNA-Insertion auf und sind homozygot in Bezug auf die T-DNA-Insertion. B: BamH I; E: EcoR I; H: Hind III; WT: Wassilewska; 8C: *cb1-8C*; 4D3: *cipk1-4D3*;

Bei der Kopplungsanalyse wurden die beiden untersuchten Mutanten-Linien mit Wildtyp-Pflanzen gekreuzt. Nach dieser Rückkreuzung ergaben sich in der ersten Generation (F1) Pflanzen, die heterozygot für das Mutanten-Allel sind. Nach einer Selbstung, also einer Selbstbestäubung dieser Pflanzen, kommt es in der F2-Generation zu einer Segregation entsprechend der mendelschen Regeln. Aufgrund des Selektionsmarkers der T-DNA-Insertion Kanamycin (Kan) wurde in der *cb1-8C*-Mutante eine nahezu perfekte 1:3-Segregation (43:133; WT:Kan-Resistenz) festgestellt. Da in der *cipk1-4D3*-Mutante das Gen für die Kanamycin-Resistenz durch Co-Suppression in einigen Pflanzen stillgelegt wurde, musste eine Kopplungsanalyse durch PCR durchgeführt werden. Auch in dieser Mutantenlinie wurde eine annähernde 1:3-Segregation (5:9) in Bezug auf die T-DNA-Insertion festgestellt. Zusammen mit dem Ergebnis der Southern-Analysen wurde damit deutlich, dass die untersuchten Mutanten jeweils nur eine T-DNA-Insertion aufweisen.

Um festzustellen, ob es sich um Mutanten handelt, bei denen die Insertion zu einer kompletten Unterdrückung der Akkumulation der entsprechenden mRNA führt, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus den Pflanzen der Linien WT, *cb1-8C* und *cipk1-4D3* isoliert, revers transkribiert und an der entstandenen cDNA eine RT-PCR mit den jeweiligen cDNA-spezifischen Genprimern CBL1-F2-RT/CBL1-R2-RT bzw. CIPK1-F2-RT/CIPK1-R2-RT durchgeführt. Als cDNA-Kontrolle wurden entsprechende Primer für TubulinB verwendet.

In Abb.6 ist zu erkennen, dass in beiden Mutantenlinien *cb1-8C* und *cipk1-4D3* im Gegensatz zum Wildtyp die Anwesenheit der mRNA des entsprechenden Genes nicht nachgewiesen werden konnte. Die erhaltenen Tubulin-PCR-Amplifikate korrespondieren mit der eingesetzten cDNA-Menge und zeigen damit an, dass die RT-PCR technisch funktioniert hatte. Da bei CBL1 eine Induktion bei Kälte bekannt ist, wurde ebenfalls eine Northern-Analyse an der RNA aus Kälte-behandelten Pflanzen von *cb1-8C* und WT durchgeführt. Als Sonde wurde die cDNA von CBL1 eingesetzt. In Wildtyp wurde die Transkription von CBL1 bei Kälte deutlich erhöht, dagegen wurde sich bei der *cb1*-Mutante keine entsprechende mRNA nachgewiesen.

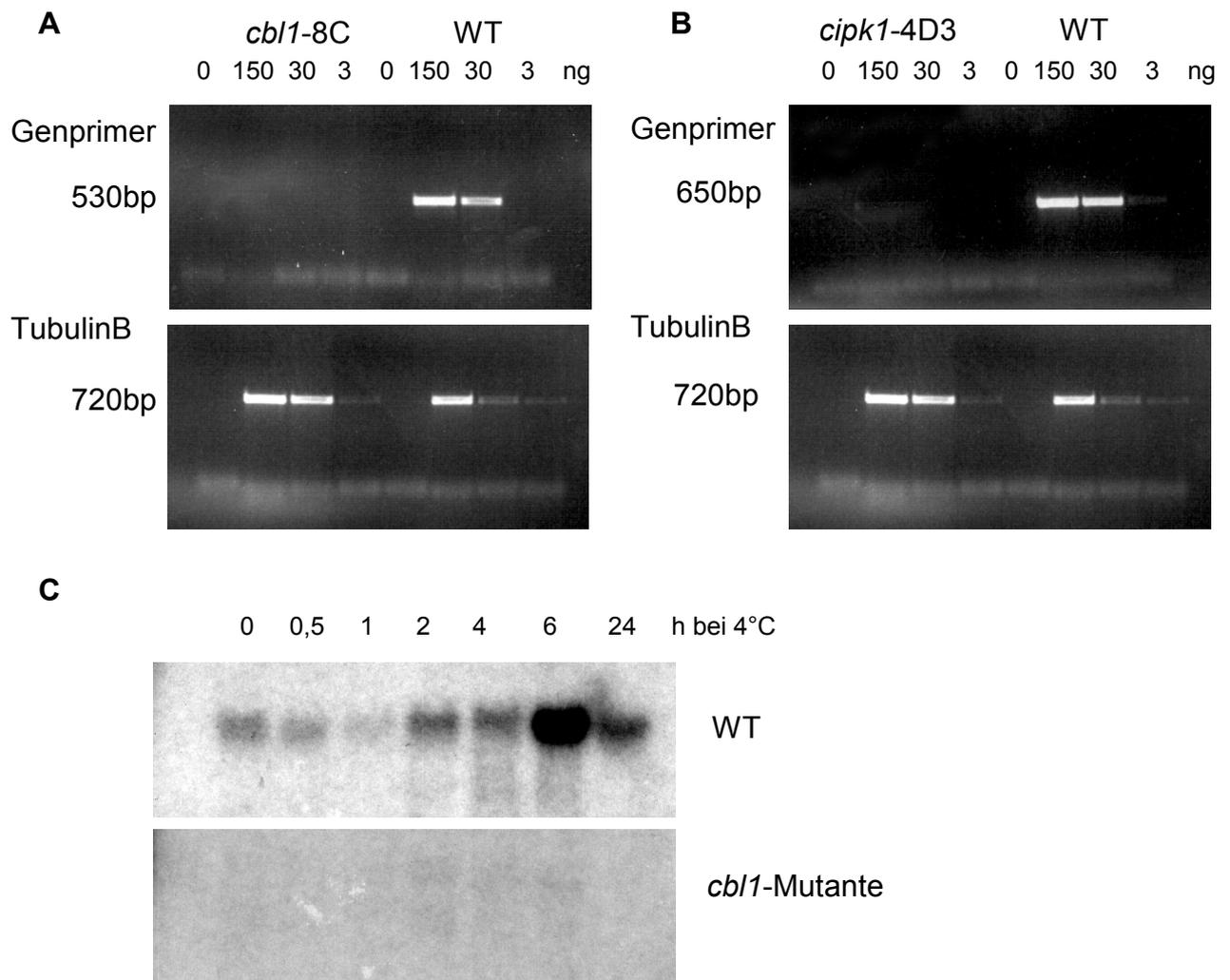


Abb. 6: Expressionsanalysen zur Untersuchung der mRNA der Gene CBL1 und CIPK1 in den Mutantenlinien *cb1-8C* und *cipk1-4D3*. A) RT-PCR an der revers transkribierten RNA aus Wildtyp- und *cb1-8C*-Pflanzen. Die *cb1*-Mutante weist keine mRNA des CBL1-Genes auf. B) RT-PCR an der revers transkribierten RNA aus Wildtyp und *cipk1-4D3*-Pflanzen. Die *cipk1*-Mutante weist keine mRNA des CIPK1-Genes auf. Als cDNA-Kontrolle wurde TubulinB verwendet. Angegeben ist jeweils die in der RT-PCR eingesetzte Menge an cDNA. Es wurden 40 Zyklen der PCR gefahren. C) Northern-Analysen an der RNA von Kälte-inkubierten Pflanzen. Angegeben ist die Zeit der Kälte-Inkubation. Hybridisiert wurde mit der CBL1-cDNA-Sonde. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigte die *cb1*-Mutante keine Induktion der RNA des CBL1-Genes. WT: Wassilewska.

Somit konnten Mutantenlinien mit T-DNA-Insertionen im CBL1- und im CIPK1-Gen isoliert werden. Beide Mutantenlinien weisen jeweils nur eine T-DNA-Insertion im Genom auf. Die T-DNA-Insertionen führen in beiden untersuchten Mutanten-Linien zu einem Funktionsverlust des Genes, da das entsprechende Protein nicht mehr exprimiert wird. Aufgrund dieser Analysen kann davon ausgegangen werden, dass

---

die Veränderungen in der Anatomie und der Physiologie bei beiden Mutanten-Linien auf die T-DNA-Insertion zurückzuführen sind.

#### 4.1.1.3 Phänotypische Analyse der *cb11*- und *cipk1*-Mutanten

Die Isolierung der Mutanten mit T-DNA-Insertionen in den CBL1- und im CIPK1-Genen erlaubte nun die *in vivo*-Analyse der Funktion beider Gene. Identifizierte Phänotypen erlauben dabei Rückschlüsse auf die Funktion der in den Genen codierten Proteine. Unter normalen Wachstumsbedingungen wurden weder unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkel) noch unter Langtagsbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) morphologische Anomalien nachgewiesen.

In früheren Untersuchungen zur Expression von AtCBL1 wurden transiente Erhöhungen der Expression von AtCBL1 unter verschiedenen Stressbedingungen wie Kälte, Verwundung oder Trockenheit festgestellt (Kudla *et al.*, 1999). Diese Expressionsstudien ließ eine Funktion des Kalzium-Sensors CBL1 in der Vermittlung von Reizantworten vermuten. Verschiedene pflanzliche Hormone wie Jasmonsäure (JA), Ethylen, Salicylsäure (SA) oder Abscisinsäure (ABA) sind an unterschiedlichen Signalprozessen beteiligt, die in Antwort auf biotische und abiotische Reize entstehen. Basierend auf Veränderungen in der Hypokotylenstreckung aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Hormone wurde ein Ansatz gewählt, der die Länge der Hypokotylen als Maßstab verwendet. Als Hormone wurden 2,4-Dichlorphenoxyacetische Säure (2,4D, ein Auxinderivat), Methyljasmonsäure (MeJA), Kinetin (Cytokininderivat) und 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC, ein Ethylenvorläufer) verwendet. Die Messungen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Hormonen an jeweils mindestens fünfzig Keimlingen in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Keines der verwendeten Pflanzenhormone führte bei der *cb11*- noch bei der *cipk1*-Mutante zu Veränderungen der Hypokotylenstreckung im Vergleich zum korrespondierenden Ökotyp Wassilewska. Als repräsentatives Beispiel werden in Abb. 7 die Verhältnisse der Hypokotylenmessungen bei Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Methyljasmonsäure gezeigt. Somit rufen weder Jasmonsäure noch Ethylen, Cytokinin oder Auxin physiologische Veränderungen im Keimling aufgrund der Mutationen hervor. Weder ABA noch SA konnten mit diesem Assay analysiert werden, da bei höheren Konzentrationen ABA das Keimen der Samen verhindert und

SA in unphysiologisch hohen Konzentrationen verwendet werden müsste, um nachweisbare Reaktionen im Wildtyp hervorzurufen.

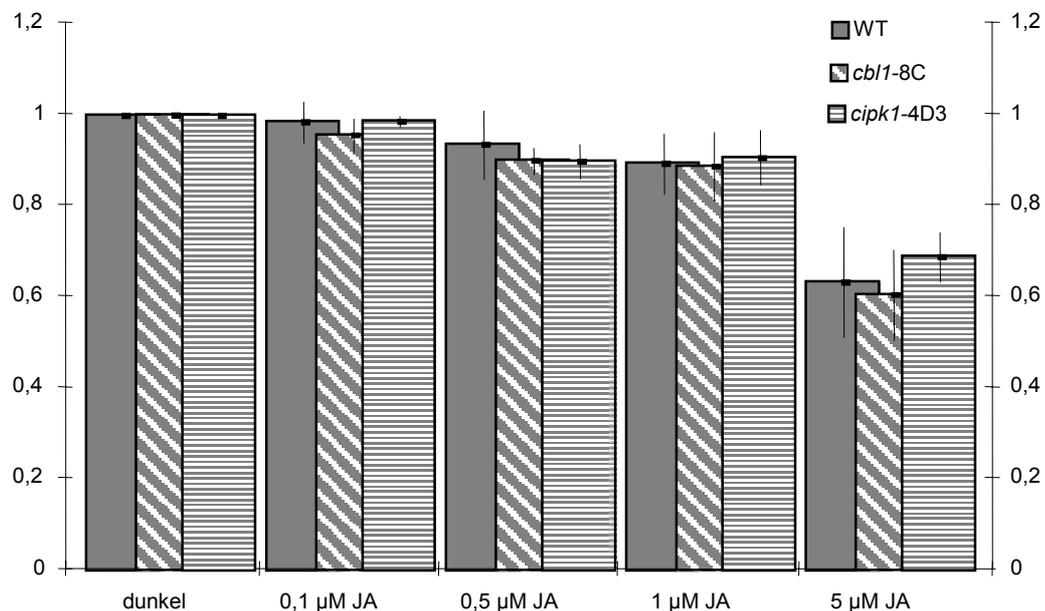


Abb. 7: Ergebnisse des Hypokotylen-Längen-Messung bei Anwesenheit des Hormons

Methyljasmonsäure. Die Samen der beiden untersuchten Mutantenlinien und des Wildtyps wurden unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Hormons Methyljasmonsäure nach der Keimungsinduktion unter Licht vier Tage im Dunkeln wachsen gelassen. Die Länge der Hypokotylen wurde gemessen. Dargestellt werden die Verhältnisse der Hypokotyl-Längen im Vergleich zur jeweiligen Dunkelkontrolle. Die entsprechenden Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken gekennzeichnet.

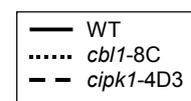
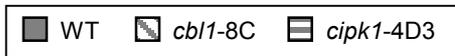
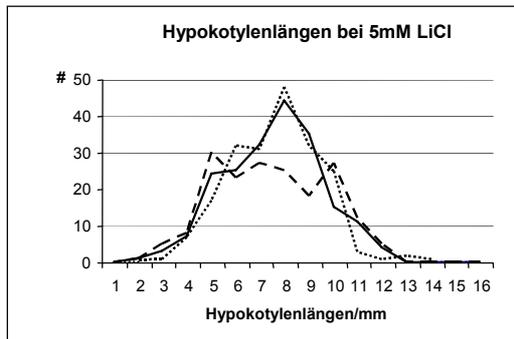
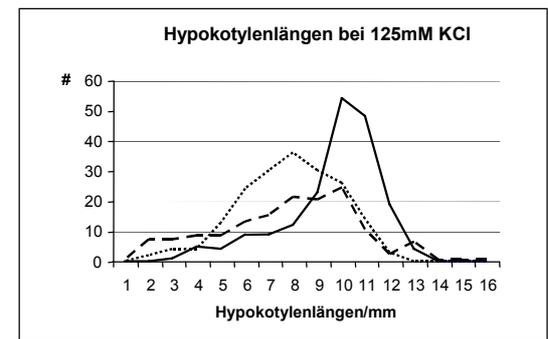
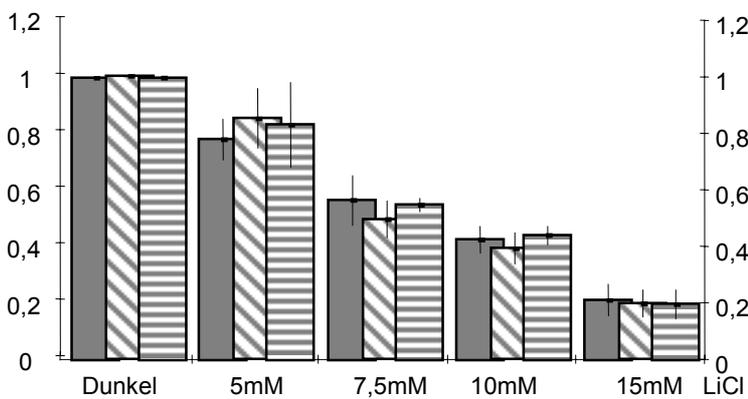
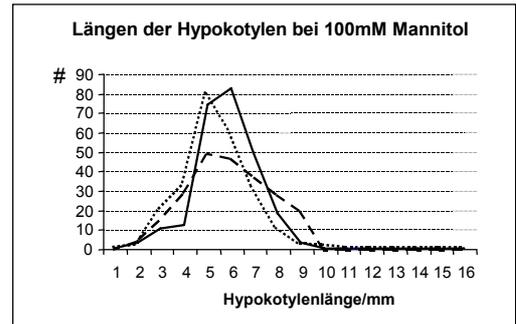
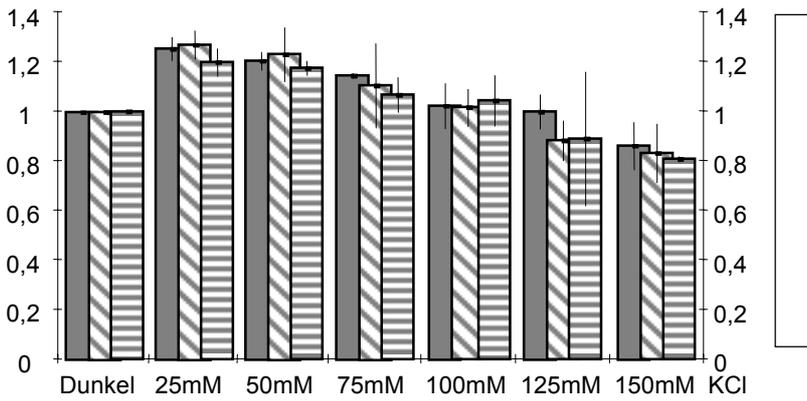
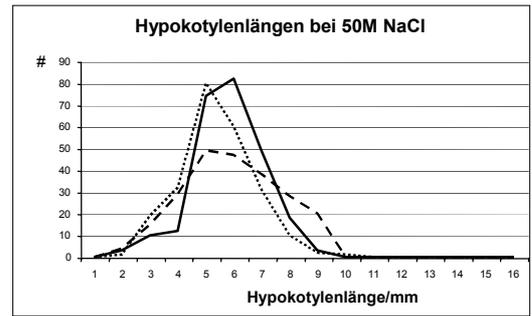
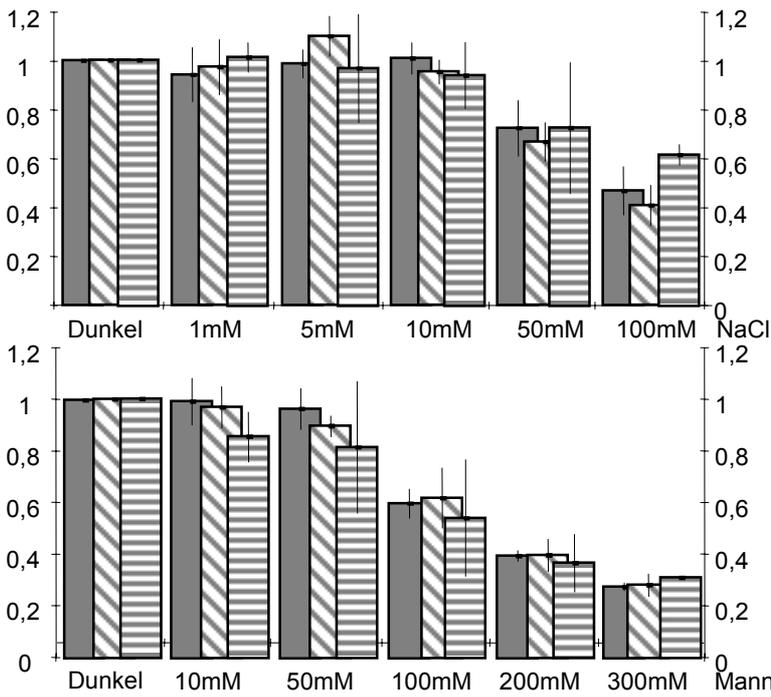
Salz ist ein weiterer abiotischer Stress, der die Expression von CBL1 induziert (Piao *et al.*, 2001). Für die Analyse der Salzstress-Sensitivität der SOS3-Mutante wurden als methodischer Ansatz die Wurzelkrümmung unter Einfluß verschiedener Salze gemessen (Liu und Zhu, 1997). In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt, bei dem der Einfluß der Salze auf die Hypokotylenstreckung gemessen wurde. Da die verwendeten Osmolyte die Samenkeimung verhindern, wurde der Assay derart verändert, dass erst nach erfolgter Induktion der Keimung die Samen auf osmolythaltige Lösungen transferiert wurden. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Konzentrationen von NaCl, LiCl, KCl und Mannitol verwendet. Wie in Abb. 8 dargestellt, wurde in diesen Analysen festgestellt, dass ab Konzentrationen von 50 mM NaCl die *cb1-8C*-Keimlinge eine kürzere Hypokotylen-Streckung aufweisen. Keine signifikanten Abweichungen waren dagegen in den Hypokotyl-Längen bei Anwesenheit von LiCl, KCl und Mannitol zu erkennen. Im Gegensatz

dazu zeigten *cipk1-4D3*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei hohen Konzentrationen von NaCl eine längere Hypokotylen-Streckung. Weder bei Anwesenheit von LiCl noch von KCl oder Mannitol liessen sich verändertes Streckungswachstum der Hypokotylen im Vergleich zu denen der Wildtyp-Keimlinge feststellen. Somit zeigen beide Mutanten-Linien, dass die Beeinflussung der Hypokotylen-Streckung Natrium-spezifisch ist und weder Lithium-Ionen noch Kalium oder Mannitol einen Einfluß haben. Die größere Streckung der Hypokotylen bei der *cipk1*-Mutante deutet auf eine erhöhte Resistenz dieser Mutante gegenüber diesem Salz hin.

Die Sensitivität der *cb1-8C*-Pflanzen gegenüber NaCl konnte anhand des osmolytischen Hypokotylen-Assays bei 1 Woche alten Keimlingen nachgewiesen werden. Um zu analysieren, ob auch Pflanzen im adulten Stadium diese Sensitivität aufweisen, wurden acht Wochen alte, unter Kurztag-Bedingungen gezogene Pflanzen untersucht. Diese wurden einmal mit 100 mM NaCl gegossen. Nach einer Woche wurde bei den *cb1-8C*-Pflanzen ein großflächiges Absterben von Zellen in den Blättern beobachtet, welches vermindert bei den WT-Pflanzen zu erkennen war (vergl. Abb. 9C). Im Gegensatz dazu zeigten die *cipk1-4D3*-Pflanzen keine Veränderung.

Da eine höhere Expression von CBL1 auch bei Trockenheit festgestellt wurden (Kudla *et al.*, 1999), wurde auch der Phänotyp der Mutanten bei Austrocknung untersucht. Dabei wurde bei zwei Wochen alten Keimlingen, die anschließend nicht mehr gegossen wurden, festgestellt, dass Pflanzen sowohl der *cb1-* als auch der *cipk1*-Mutante nach vierzehn Tagen im Gegensatz zu Wildtyp-Keimlingen abgestorben sind und somit deutlich sensibler gegenüber Trocken-Stress sind als der Wildtyp (vergl. Abb. 9A). Als weiterer abotischer Reiz wurde Hitze analysiert, wobei die Pflanzen zwei Wochen auf MS-Platten gezogen, 24 Stunden bei 38°C inkubiert und anschliessend unters Licht gestellt wurden. Auch bei Hitze zeigten sowohl *cb1-8C-* als auch von *cipk1-4D3-* Keimlinge eine schnellere Ausbleichung aufgrund des einsetzenden oxidativen Stresses als der Wildtyp (Abb. 9B). Sowohl die Reaktionen bei Austrocknung als auch bei Hitze-Inkubation wurden in mehreren Versuchen verifiziert.

Abb. 8: Ergebnisse der Hypokotylen-Längen-Messung bei Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von NaCl, Mannitol, KCl und LiCl. Dazu wurde die Keimung der Samen induziert und nach einem Tag im Dunkeln die Osmolyte zugegeben. Dargestellt werden auf der linken Seite die Verhältnisse der Messungen der Hypokotyl-Längen im Vergleich zu denen der jeweiligen Dunkelkontrolle. Die entsprechenden Standardabweichungen werden angezeigt. Rechts wird die Verteilung der gemessenen Hypokotyl-Längen bei 50 mM NaCl, 100 mM Mannitol, 125 mM KCl bzw. 5 mM LiCl gezeigt. Anhand dieser Messungen zeigt sich eine Reduzierung der Hypokotyl-Streckung von *cb11*-Keimlingen bei Anwesenheit von NaCl, die bei den anderen Osmolyten nicht signifikant ist. Keimlinge der *cipk1*-Mutante zeigen dagegen eine größere Streckung der Hypokotylen bei Anwesenheit von NaCl nicht aber bei Vorhandensein der anderen Osmolyte.



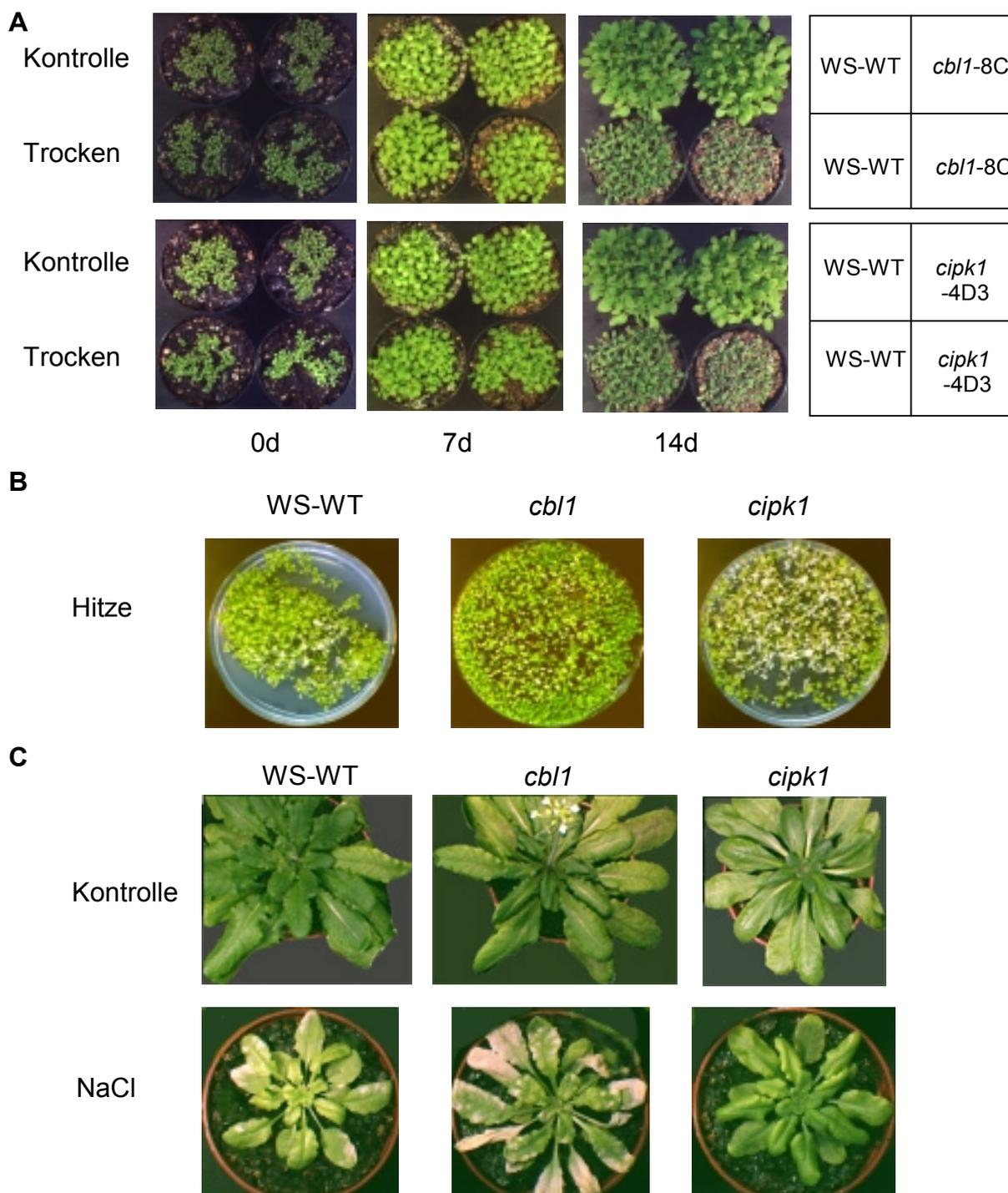


Abb. 9: Phänotypen der *cb1*- und der *cipk1*-Mutanten bei Einwirkung verschiedener abiotischer Reize.

A) Trocken-Behandlung zwei Wochen alter Keimlinge. Dafür wurde den Pflanzen Wasser vorenthalten, während die Kontroll-Pflanzen weiterhin gegossen wurden. B) Hitze-Behandlung an zwei Wochen alten Keimlingen. Diese wurden 24 Stunden bei 38°C inkubiert und anschließend unters Licht gestellt. C) Salz-Behandlung der acht Wochen alten Pflanzen durch Gießen mit 100 mM NaCl und deren Phänotyp nach einer Woche. Die Pflanzen der *cb1*-Mutante reagierten sensibler bei den abiotischen Reizen wie Austrocknung, Hitze oder Salz. Ebenso zeigte die *cipk1*-Mutante dieselbe Sensitivität gegenüber Austrocknung und Hitze war dagegen resistenter gegenüber Salz. WT: Wassilewska; d: Tage.

---

Abiotische Reize wie Austrocknung, Hitze und Salz führen bei den *cbl1*- und *cipk1*-Mutanten zu phänotypischen Veränderungen. Dabei konnte in beiden Mutanten eine größere Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung und Hitze als beim Wildtyp festgestellt werden. Anfälliger auf Anwesenheit von NaCl zeigte sich die *cbl1*-Mutante während die *cipk1*-Linie unempfindlicher gegenüber diesem Salz war. Sowohl das CBL1-Protein als auch CIPK1 scheinen somit in Stressantwortvermittelten Signalwegen involviert zu sein.

#### 4.1.1.4 Herstellung von Doppelmutanten

Phänotypische Analysen von Doppelmutanten erlauben einen genetischen Ansatz zur Untersuchung, ob beide durch die Mutationen betroffenen Proteine in denselben Signalwegen wirken. Sollte dies der Fall sein, so verstärkt sich der beobachtete Phänotyp. Um die Frage zu adressieren, ob CBL1 und CIPK1 in denselben Signalwegen agieren, wurden beide Mutanten gekreuzt, in der F2-Generation homozygote Pflanzen isoliert und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

#### 4.1.1.5 Komplementation der Mutanten

Um zu zeigen, dass die beobachteten Phänotypen auf das Fehlen des Proteins aufgrund der T-DNA-Insertion zurückzuführen sind, werden die Mutanten mit der cDNA des entsprechenden Genes komplementiert. Dazu wurden transgene Pflanzen erzeugt, die die cDNA des ausgeschalteten Genes mit einem vorgeschalteten 35S-CaMV-Promotor exprimieren. Die T1-Generation dieserart erzeugter Komplementationslinien von *cbl1*-8C weisen als junge Pflanzen verzögerten Wuchs auf. Diese Pflanzen zeigen aber nach dieser Phase ein normales Blühverhalten. Aufgrund der konstitutiven Expression durch den 35S-Promotor kann eine Überexpression des CBL1-Proteines erfolgen. Da die Mitwirkung von CBL1-Proteinen in verschiedenen Reizantworten nachgewiesen worden ist, scheinen durch die Überexpression diese Signalwege dauerhaft aktiviert zu sein. Die Pflanze zeigt einen Wuchs wie bei Vorhandensein von abiotischen Stress.

Mit der T2-Generation dieser Pflanzen sollen in Zukunft dieselben Versuche wie an den Mutanten durchgeführt werden, um eine Komplementation nachzuweisen.

#### 4.1.2 Subzelluläre Lokalisation der CBL1- und CIPK1-Proteine

Um die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle feststellen zu können, werden die cDNA eines Genes im Leseraster (dem Triplet-Code der Aminosäuren entsprechend) vor das Gen des grünen fluoreszierenden Proteines (GFP) kloniert und das entstehende Fusionsprotein in Pflanzen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen. Vor diesem GFP-Gen wurden die cDNA von AtCBL1 (CBL1-1-GFP-pGPTV) bzw. von AtCIPK1 (CIPK1-GFP-pGPTV) kloniert und diese als auch GFP-pGPTV als Kontrolle in *A. thaliana* transient oder stabil transformiert.

Die transiente Transformation der GFP-Fusionsproteine erlaubt festzustellen, ob das Protein exprimiert wird und ist eine Methode, um innerhalb kurzer Zeit die Lokalisation der Proteine in der Zelle zu analysieren. Da bei einer transienten Transformation die Protein-Expression spätestens nach 24 Stunden nachlässt und die Expression in den Epidermis-Zellen relativ schwach ist, wurden für die Untersuchung vor allem die Trichome verwendet. Da die Trichome eine starke Eigenfluoreszenz aufweisen, muss deutlich zwischen dieser und der GFP-Fluoreszenz unterschieden werden. In diesen Untersuchungen wurde eine Lokalisation des CBL1-GFP-Fusionsproteins an der Plasmamembran der Zellen festgestellt (Abb. 10). Dies entspricht auch der Vorhersage anhand der Proteinstruktur, da das Protein sowohl eine potentielle Myristylierungs- als auch eine Palmetylierungsstelle aufweist, die beide auf Membranbindungen hindeuten (Yalovsky *et al.*, 1999). Ebenfalls eine Membranlokalisation weist das Fusionsprotein von AtCIPK1 auf. Das GFP dagegen ist in der Kontrolle im Zytoplasma und nukleär lokalisiert. Da die mit CBL1-pGPTV transfizierten Blätter schon innerhalb von acht Stunden absterben, die Expression der Proteine aber erst etwa fünf Stunden nach Transfektion einsetzt, ist dieser Methode ein deutliches Zeitlimit gesetzt. Deshalb wurden die GFP-Fusionskonstrukte ebenfalls stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Für das CBL1-Protein als auch das GFP konnten in der T1-Generation die im transienten Ansatz nachgewiesene subzelluläre Lokalisationen auch in den stabil transformierten Pflanzen verifiziert werden.

Während das GFP-Protein im Zytoplasma und Nukleus der Zelle verteilt vorliegt, wurde für die CBL1- und CIPK1-GFP-Fusionsproteine eine Plasmamembran-Lokalisation festgestellt.

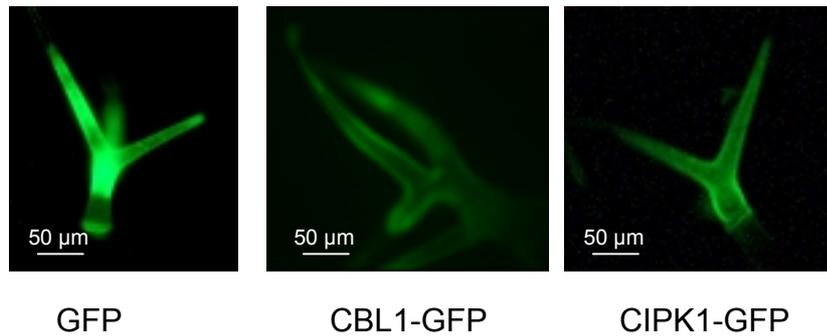
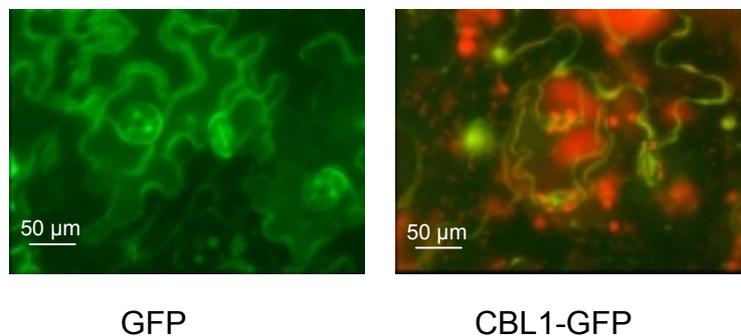
**A****B**

Abb. 10: Subzelluläre Lokalisationen von AtCBL1 und AtCIPK1.

A) GFP-Fusionsproteine von AtCBL1 und AtCIPK1 sowie GFP als Kontrolle wurden transient in die Blätter von *A. thaliana* transformiert. Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine war in den Trichomen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop nachweisbar, wobei sowohl CBL1-GFP als auch CIPK1-GFP eine Plasma-Membran-Lokalisation aufweisen, das GFP selber aber im Zytoplasma und dem Nukleus vorliegt. B) Untersuchungen der Lokalisation nach der stabilen Transformationen von CBL1-GFP und GFP. Lokalisationen der Proteine ist in den Epidermis-Zellen der Blätter der T1-Generation sichtbar.

### 4.1.3 AtCBL1 zieht AtCIPK1 an die Plasmamembran

In Wildtyp-Pflanzen wurde sowohl für das CBL1- als auch für das CIPK1-GFP-Fusionsprotein eine subzelluläre Lokalisation an der Plasmamembran festgestellt. Der Ansatz der Identifizierung der subzellulären Lokalisation durch GFP-Fusionsproteine erlaubt auch die Klärung der Frage, ob das CBL1-Protein mit CIPK1 *in vivo* interagiert. Dazu wurde das CIPK1-GFP-Fusionsprotein transient in die Blätter der *cb1-1*-Mutante transformiert. Da CIPK1 weder hydrophile und damit membrangängige Domänen noch Aminosäure-Sequenzen für Lipidmodifikationen wie Myristylierung aufweist, müsste dieses Protein zytoplasmatisch lokalisiert sein. Tatsächlich lag das CIPK1-GFP-Fusionsprotein bei Abwesenheit des CBL1-Proteins im Zytoplasma vor (Abb. 11). Erst eine Kotransfektion des CIPK1-GFP-Fusionsproteins mit dem CBL1-Protein ohne GFP zeigte wieder die in Wildtyp-Pflanzen nachgewiesene Lokalisation an der Plasmamembran.

Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das CBL1-Protein *in vivo* mit CIPK1 interagiert. Dabei zieht das CBL1-Protein die Kinase an die Plasmamembran.

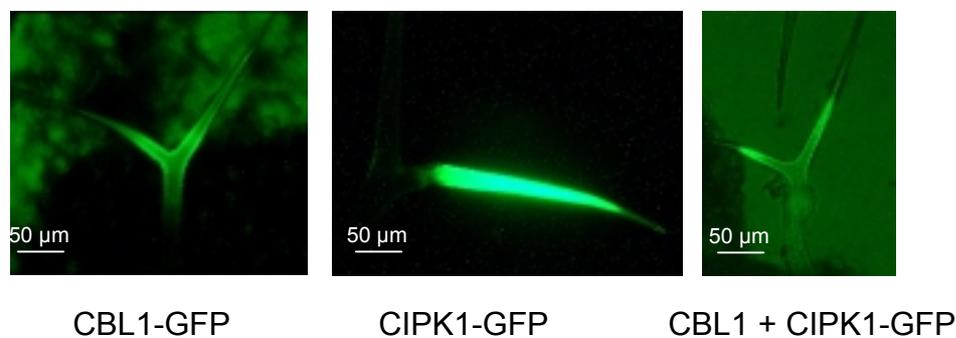


Abb. 11: Das CBL1-Protein zieht CIPK1 an die Plasmamembran. Transiente Transformation von CBL1-GFP und CIPK1-GFP in die Blätter der *cb1-1*-Mutante. Das CBL1-GFP-Fusionsprotein ist auch in der Mutante Plasmamembran-lokalisiert. Das CIPK1-GFP-Fusionsprotein zeigt dagegen bei Abwesenheit des CBL1-Proteins eine zytoplasmatische Lokalisation. In der Kotransfektion von CIPK1-GFP und CBL1 wird die Kinase dagegen wieder an die Plasmamembran gezogen.

---

#### 4.1.4 Die NAF-Domäne von AtCIPK1 ist ein spezifisches Protein-Protein-Interaktionsmodul

Aufgrund der Ergebnisse der CBL-CIPK-Lokalisationsstudie wurde nachgewiesen, dass AtCBL1 nicht nur im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit AtCIPK1 interagiert, sondern diese Interaktion auch *in vivo* in der Pflanze stattfindet. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays sollte die Interaktionsdomäne identifiziert werden, an die das AtCBL1-Protein an AtCIPK1 bindet.

Da das AtCBL1-Protein wahrscheinlich durch die Lipidmodifikationen der Myristylierung und Palmetylierung an die Membran gebunden wird und solche Membranlokalisationen die Interaktionen in der Hefe beeinflussen können, wurde statt AtCBL1 das vermutlich zytoplasmatisch-lokalisierte AtCBL2, das in Hefe ebenfalls mit AtCIPK1 interagiert, für diese Interaktionsstudien verwendet. Für die Interaktions-Analysen zur Kartierung der Interaktionsdomäne wurden beide Reportergene, Histidin-Synthase (Wachstum auf Histidin-Selektionsplatten) und  $\beta$ -Galaktosidase (*o*NPG-Assay), zum Nachweis der Interaktion verwendet. In vorangegangenen Studien in der Diplomarbeit von Olga Ritz (Ritz, 2000) wurde die Interaktionsdomäne auf ein 36 Aminosäuren langes Fragment im variablen C-Terminus von AtCIPK1 beschränkt. In weitergehenden Interaktions-Analysen wurde in dieser Arbeit die Interaktionsdomäne auf einen 24 Aminosäuren umfassenden Bereich (KinD8) weiter eingegrenzt (vergl. Abb. 12). Wird diese Domäne durch gerichtete Deletions-Mutagenese aus der Kinase entfernt (NAFdel), so unterbleibt die Interaktion zwischen CBL2 und CIPK1. Mit Hilfe von in der Basensequenz veränderten Primern zur Amplifikation der Interaktionsdomäne wurden durch PCR gezielt einzelne dieser 24 Aminosäuren abgeändert (KinD81 bis KinD86). Durch die Veränderung in der Interaktionsstärke mit dem CBL2-Protein wurden die funktionell wichtigen Aminosäuren innerhalb dieser Domäne analysiert. Da sowohl das Prolin am Anfang des 24 Aminosäuren langen Fragmentes als auch das Phenylalanin am Ende für die Interaktion notwendig sind, stellt diese Domäne wahrscheinlich das minimale Protein-Protein-Interaktionsmodul dar (vergl. Abb. 13).

Mit diesen Analysen wurde diese 24 Aminosäuren umfassende Domäne als das minimale Interaktionsmodul zwischen AtCBL2 und AtCIPK1 identifiziert und die Bedeutung einzelner konservierter Aminosäuren für diese Interaktion erfaßt.

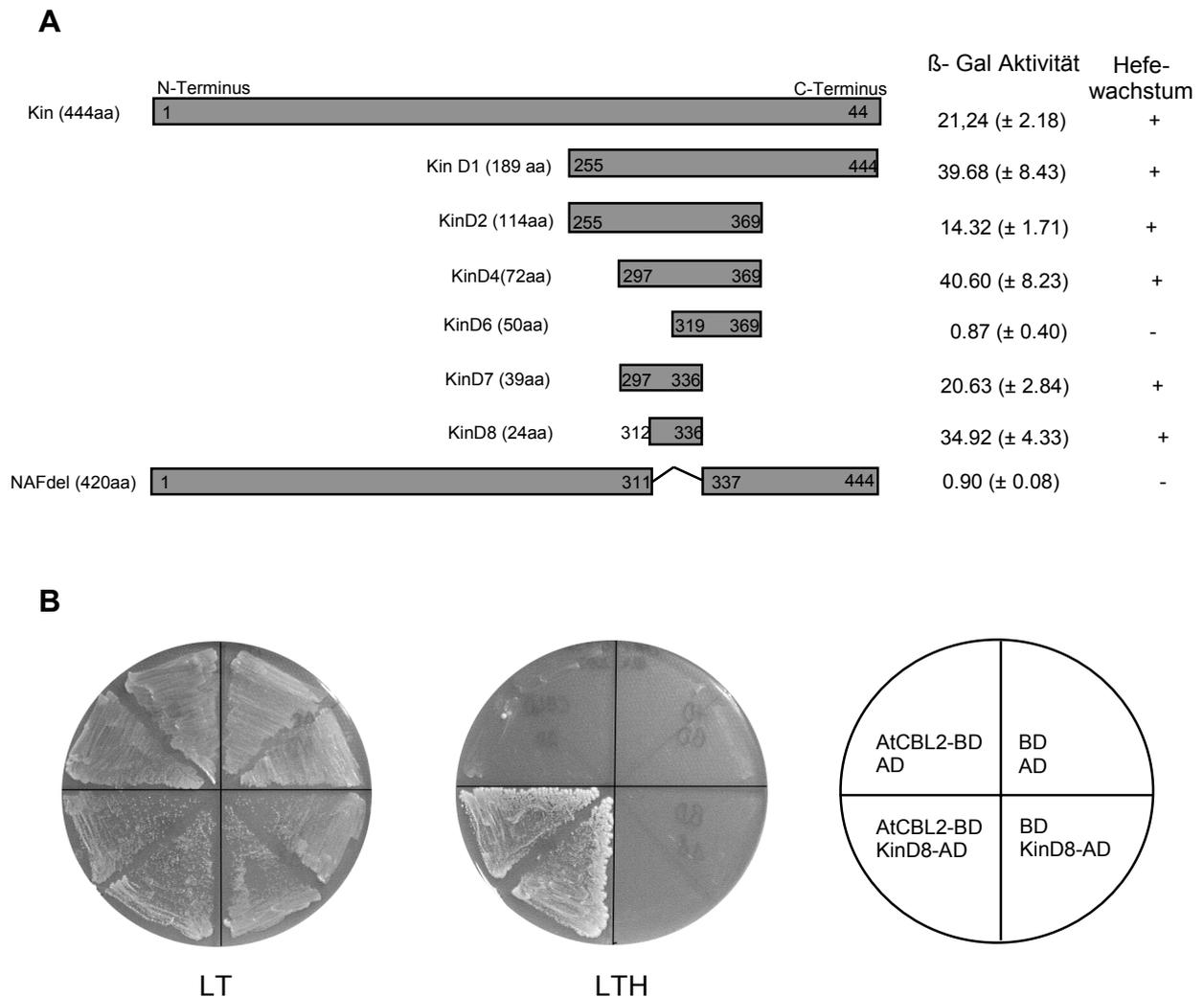


Abb. 12: Identifizierung der die Interaktion mit AtCBL2 vermittelnden Domäne in AtCIPK1.

A) Deletionsanalysen im Hefe-Zwei-Hybrid-System zur Identifizierung der Interaktionsdomäne von AtCIPK1. Nachweis der beiden Reportergene durch Hefewachstum auf Histidin-freiem Medium und oNPG-Assays wurde als Interaktionsnachweis herangezogen. Die Positionen der Deletionen in der Aminosäuresequenz werden in den Balken angezeigt. Die Größe der einzelnen Deletionsfragmente sind in Klammern angegeben. B) Untersuchung der Interaktion von KinD8 mit CBL2 in einem Wachstumsnachweis. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Hefe-Konstrukte dargestellt. LT: Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan; LTH: Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin unter Zugabe von 25 mM 3AT.

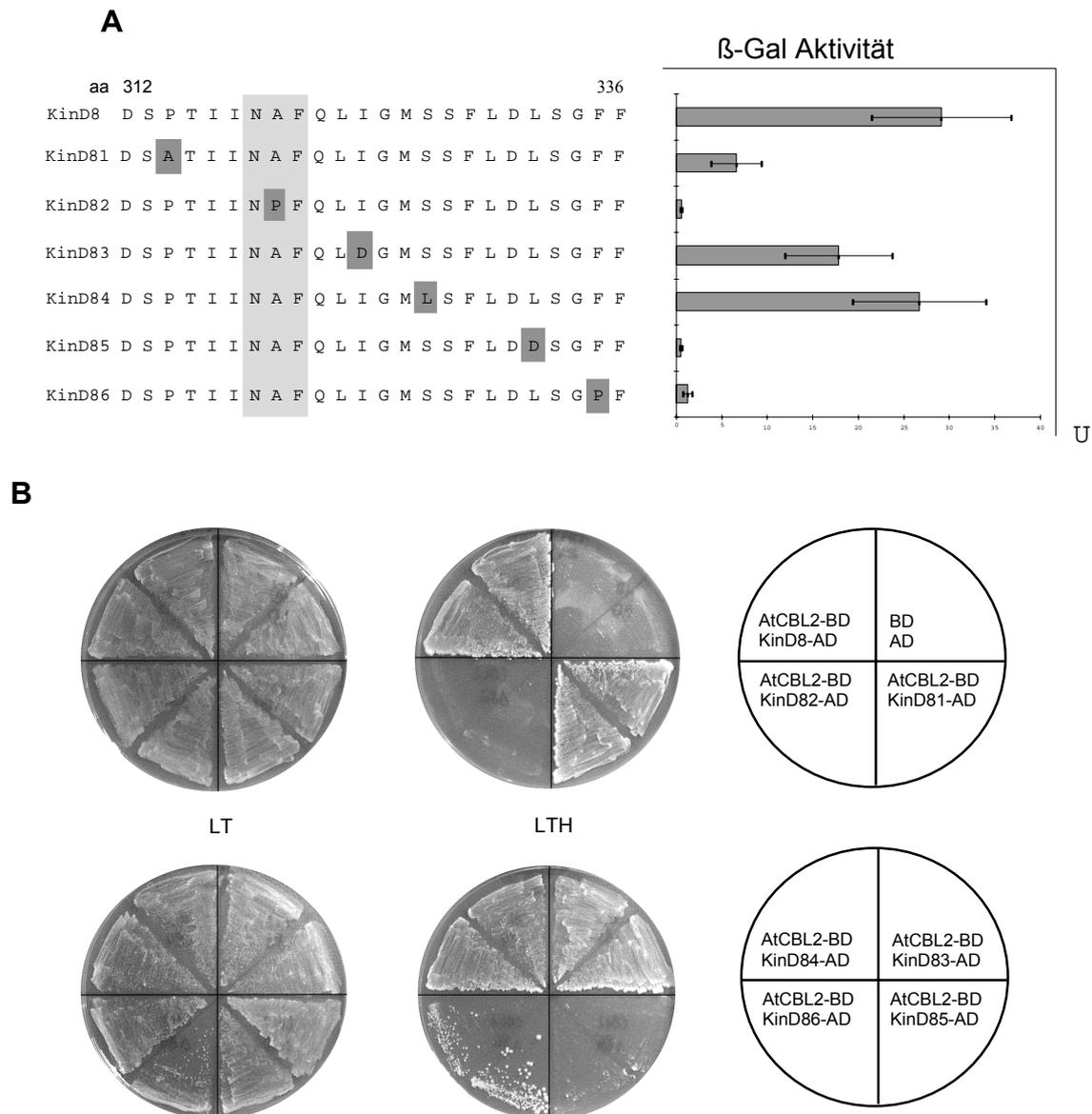


Abb. 13: Effekte von Mutationen in der NAF-Domäne.

A) Darstellung der NAF-Domäne sowie der eingeführten Mutationen, hellgrau unterlegt die Aminosäuren, nach denen die Domäne bezeichnet wird, dunkelgrau unterlegt diejenigen Aminosäuren, die verändert worden sind. KinD8 stellt den Wildtyp der Domäne dar, KinD81 bis KinD86 die jeweiligen mutierten Domänen. Die Stärke der Interaktion von AtCBL2 mit der veränderten Interaktionsdomäne wurde anhand der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase durch den oNPG-Assay in drei unabhängigen Messungen ermittelt. B) Nachweis der Interaktionen von KinD8, KinD81 bis KinD86 mit AtCBL2 in einem Wachstumsassay. Rechts sind jeweils die Hefe-Konstrukte angegeben. Anhand beider Reportergene wurde eine deutliche Reduzierung der Interaktionsstärke von AtCBL2 festgestellt, wenn konservierte Aminosäuren wie Prolin zu Beginn und Phenylalanin am Ende der Domäne verändert wurden. LT: Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan; LTH: Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin unter Zugabe von 25 mM 3AT.

Ein Sequenz-Vergleich der 24 Aminosäuren von CIPK1 mit den C-Terminalen Domänen anderer CIPKs aus *Arabidopsis*, die durch eine Interaktion in Zwei-Hybrid-Analysen mit AtCBL1 identifiziert worden sind, zeigte, dass die analysierte Domäne in diesen Kinasen ebenfalls konserviert ist (Abb. 14A). Datenbankanalysen ergaben, dass diese Domäne auch in Protein-Kinasen aus anderen Pflanzen-Arten vorkommt und hochkonserviert ist (vergl. Abb. 14B). Aufgrund der konservierten Aminosäuren Asparagin (N), Alanin (A) und Phenylalanin (F) wurde diese Domäne als NAF-Domäne bezeichnet.

### A

AtCIPK1	D	T	P	T	I	I	N	A	F	Q	L	I	G	M	T	T	F	L	D	L	T	G	F	F	24
AtCIPK2	P	R	L	A	T	L	N	A	F	D	I	I	A	L	S	T	G	F	G	L	A	G	L	F	24
AtCIPK3	E	Q	P	A	A	I	N	A	F	E	I	I	S	M	S	R	G	L	N	L	E	N	L	F	24
AtCIPK4	K	S	S	N	A	I	T	A	F	D	L	I	S	L	S	S	G	L	D	L	S	G	L	F	24

### B

AtCIPK1	D	S	P	T	I	I	N	A	F	Q	L	I	G	M	S	S	F	L	D	L	S	G	F	F	24
McSTPK	K	E	P	E	M	L	N	A	F	H	I	I	S	L	S	Q	G	F	D	L	S	P	L	F	24
OsPK4	T	R	P	A	S	L	N	A	F	D	I	I	S	F	S	K	G	F	D	L	S	G	L	F	24
OsPK7	P	R	P	A	S	L	N	A	F	D	I	I	S	F	S	K	G	F	N	L	S	G	L	F	24
SbSNFL1	E	E	P	V	A	L	N	A	F	E	L	I	S	M	S	A	G	L	N	L	G	N	L	F	24
SbSNFL2	E	E	P	V	V	L	N	A	F	E	L	I	S	R	S	A	G	L	N	L	G	N	L	F	24
SbSNFL3	S	S	L	P	N	L	N	A	F	D	I	I	S	L	S	T	G	F	D	L	S	N	L	F	24
TaWPK4	P	R	P	A	S	L	N	A	F	D	I	I	S	F	S	R	G	F	N	L	S	G	L	F	24
ZmPK4	P	R	P	A	S	L	N	A	F	D	I	I	S	F	S	R	G	F	N	L	S	G	L	F	24

Abb.14: Die NAF-Domäne ist ein konserviertes Protein-Protein-Interaktionsmodul.

A) Aminosäure-Sequenz-Vergleich der NAF-Domäne von AtCIPK1 bis AtCIPK4. B) Aminosäure-Sequenz-Vergleich der NAF-Domäne von AtCIPK1 mit den entsprechenden Domänen aus anderen Arten wie McSTPK aus *Mesembryanthemum cristallatum* (Proteinzugangnummer AAD31900), PK4 und 7 aus Reis (BAA83688.1, BAA83689.1), den SNFL-Protein-Kinasen 1 bis 3 aus *Sorghum bicolor* (T14735, T14736, T14822), TaWPK4 aus Weizen (BAA34675.1) und ZmPK4 aus Mais (AAF22219.1). Mit schwarzen Boxen sind jeweils diejenigen Aminosäuren unterlegt, die in der Hälfte der verglichenen Sequenzen identisch sind. Diese Vergleiche zeigen, daß die Aminosäuren der NAF-Domäne in diesen Proteinen hoch-konserviert sind.

Um die Frage zu adressieren, ob der identifizierte Bereich eine Interaktion mit allen bekannten CBL-Proteinen aus *Arabidopsis* vermittelt, wurde die NAF-Domäne jeweils zusammen mit AtCBL1 bis AtCBL6 in Hefen transformiert und deren Interaktionen untersucht. Wie in Abb. 15A dargestellt ist, interagieren alle sechs untersuchten CBL-Proteine mit der NAF-Domäne von CIPK1. In einem weiteren

---

Experiment wurde untersucht, ob die NAF-Domäne von Kinasen aus anderen Pflanzenspezies eine Interaktion mit den CBL-Proteinen vermittelt. Dazu wurde die NAF-Domäne der Protein-Kinase SNFL3 (Sucrose non fermenting-like 3) aus *Sorghum bicolor* isoliert, kloniert und die Interaktion dieser NAF-Domäne aus Sorghum (SbSNFL3-D8) im Zwei-Hybrid-System mit dem AtCBL2-Protein untersucht. Auch diese NAF-Domäne aus der heterologen Protein-Kinase vermittelte, wie in Abb. 15B erkennbar, die Interaktion mit dem CBL-Protein. Diese Domäne ist somit nicht nur *Arabidopsis*-spezifisch, da auch NAF-Domänen-besitzende Protein-Kinasen aus anderen Pflanzenspezies mit den Kalzium-Sensor-Proteinen interagieren. Diese Ergebnis macht es sehr wahrscheinlich, dass die NAF-Domäne ein generelles CBL-Protein-Interaktionsmodul darstellt. Das bedeutet, dass alle Kinasen, die eine derartige Domäne enthalten mit Kalzium-Sensor-Proteinen des CBL-Typen interagieren und somit Bestandteil von Kalzium-vermittelten Signalwegen sind.

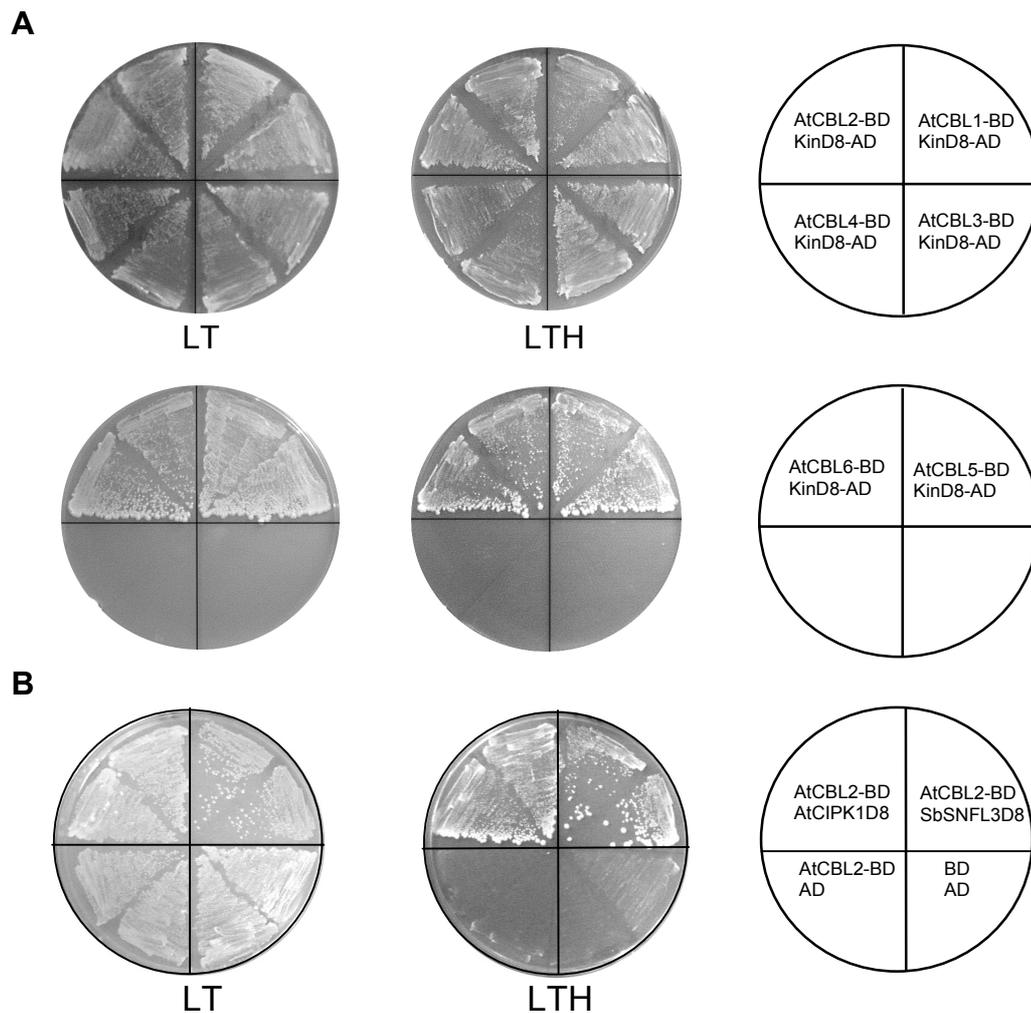


Abb. 15: Die NAF-Domäne von Protein-Kinasen vermittelt die Interaktion mit CBL-Proteinen.

A) Analyse der Interaktion von Proteine von CBL1 bis 6 mit der NAF-Domäne von CIPK1 im Zwei-Hybrid-System. Rechts sind jeweils die Hefe-Konstrukte angegeben. Alle sechs untersuchten CBL-Proteine binden an die NAF-Domäne von CIPK1. B) Analyse der Interaktion der NAF-Domäne einer heterologen Proteinkinase aus *Sorghum bicolor* mit dem CBL2-Protein im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Rechts sind jeweils die Hefe-Konstrukte angegeben. Die NAF-Domäne der heterologen Kinase aus *Sorghum bicolor*, SbSNFL3D8, vermittelt ebenfalls die Interaktion mit dem CBL2-Protein aus *Arabidopsis*. LT: Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan; LTH: Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin unter Zugabe von 25 mM 3AT.

#### 4.1.5 Die AtCBL- und AtCIPK-Proteinfamilien

Aufgrund von Datenbank-Analysen mit Hilfe der Sequenzdatenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurde anhand von Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz im BLAST-Algorithmus neben den bis dahin schon identifizierten AtCBL1 bis AtCBL6 (Ritz, 2000) nach der vollständigen Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms weitere vier AtCBLs identifiziert. Die cDNAs von dreien dieser identifizierten CBLs wurde mit genspezifischen Primern durch PCR aus vorhandenen cDNA-Banken isoliert und kloniert. Nach erfolgter Sequenz-Analyse wurden diese als AtCBL7, AtCBL8, und AtCBL9 bezeichnet (vergl. Tab. 2). Das vierte identifizierte AtCBL (AtCBL10) wird derzeit aus cDNA-Banken isoliert. Die zehn identifizierten Kalzium-Sensoren zeigen alle die für die CBLs eigenen Charakteristikas in der Aminosäure-Sequenz wie z.B. die drei EF-Hand-Motive zur Kalzium-Bindung.

Name	cDNA-Größe (bp)	Introns	Protein (Datenbanknummer)	Gen (Datenbanknummer)
AtCBL1	642	ja	AAG26008	AF076251
AtCBL2	681	ja	AAC26009	AF076252
AtCBL3	681	ja	AAC26010	AF076253
AtCBL4	669	ja	AAG28402	AF192886
AtCBL5	612	ja	AAG28401	AF192885
AtCBL6	681	ja	AAG28400	AF192884
AtCBL7	645	ja	AAG10059	AF290434
AtCBL8	645	ja	AAG10058	AF290433
AtCBL9	642	ja	AAL10301.1	AF411958

Tab. 2: Auflistung der bisher isolierten und klonierten AtCBLs mit ihrer jeweiligen cDNA-Größe sowie Anwesenheit von Introns im Gen. Die Zugangsnummern der Proteine und cDNA-Sequenzen in der Datenbank sind angegeben.

Um die Komplexität der im *Arabidopsis*-Genom kodierten CIPKs zu ermitteln, wurden im Labor von Jörg Kudla Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit insgesamt drei verschiedenen AtCBL-Proteinen als Köder (AtCBL1, AtCBL4 und AtCBL6) durchgeführten. Dabei wurden fünfzehn weitere interagierende Protein-Kinasen identifiziert, die ebenfalls alle die NAF-Domäne aufweisen. Die cDNA dieser Proteine wurde ebenso mit Hilfe von PCR aus verschiedenen cDNA-Banken isoliert, kloniert

und sequenziert. Die derart isolierten CIPKs (CBL-interagierende Protein-Kinasen) wurden als AtCIPK2 bis AtCIPK16 bezeichnet (vergl. Tab. 3). Nach weiteren Datenbank-Analysen wurde die Anzahl der im *Arabidopsis*-Genom kodierten AtCIPKs auf insgesamt 25 AtCIPKs ermittelt.

Name	SnRK	cDNA-Größe (bp)	Introns	Protein (Datenbank)	Gen (Datenbank)
AtCIPK1	SnRK3.16	1335	ja	AAG28776	AF302112
AtCIPK2	SnRK3.2	1371	nein	AAF86506	AF286050
AtCIPK3	SnRK3.17	1128	ja	AAF86507	AF28051
AtCIPK4	SnRK3.3	1281	nein	AAG01367	AY007221
AtCIPK5	SnRK3.24	1296	nein	AAF86504	AF28105
AtCIPK6	SnRK3.14	1326	nein	AAF86505	AF285106
AtCIPK7	SnRK3.10	1290	nein	AAK16682	AF290192
AtCIPK8	SnRK3.13	1230	ja	AAK16683	AF290193
AtCIPK9	SnRK3.12	1350	ja	AAK16684	AF295664
AtCIPK10	SnRK3.8	1440	nein	AAK16685	AF295665
AtCIPK11	SnRK3.22	1308	nein	AAK16686	AF295666
AtCIPK12	SnRK3.9	1470	nein	AAK16687	AF295667
AtCIPK13	SnRK3.7	1509	nein	AAK16688	AF295668
AtCIPK14	SnRK3.15	1329	nein	AAK16689	AF295669
AtCIPK15	SnRK3.1	1266	nein	AAK16692	AF302111
AtCIPK16	SnRK3.18	1510	ja	AAF19215	AY030304
AtCIPK17	SnRK3.21	1266	ja	AAK64513	AY036958
AtCIPK18	SnRK3.20	1563	nein	AAK59695	AY034099
AtCIPK19	SnRK3.5	1452	nein	AAK50347	AY030303
AtCIPK20	SnRK3.6	1320	nein	AAK61493	AY035225
AtCIPK21	SnRK3.4	1251	ja	AAK59696	AY034100
AtCIPK22	SnRK3.19	1338	ja	AAL47845	AF450478
AtCIPK23	SnRK3.23	1449	ja	AAK61494	AY035226
AtCIPK24	SnRK3.11	1341	ja	AAK72257	AF395081
AtCIPK25	SnRK3.26	1461	nein	AAL41008	AF448226

Tab. 3: Auflistung der bisher isolierten und klonierten AtCIPKs mit der jeweiligen Bezeichnung in der SnRK-Nomenklatur. Weiterhin sind die cDNA-Größen und die Anwesenheit von Introns im Gen angegeben. Ebenso werden die Zugangsnummern der Proteine und cDNA-Sequenzen in der Datenbank angezeigt. Die AtCIPKs 17 bis 25 wurden von Stefan Weini (Weini, 2001) isoliert, kloniert und sequenziert.

---

Es wurde ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten AtCIPKs in einem Alignment durchgeführt, wobei der CLUSTAL-Algorithmus im DNASTAR-Programm benutzt wurde. Abb. 16 zeigt die zwei Domänen-Struktur diese Protein-Kinasen. Paarweise Vergleiche der Aminosäuren-Sequenz dieser Domänen ergaben eine 51-90% Identität der N-Terminalen Domäne sowie eine 63-96% Ähnlichkeit. Der variable C-Terminus lässt nur eine Konservierung in der NAF-Domäne erkennen. Diese NAF-Domäne zeigt eine 58-86% Identität und 66-94% Ähnlichkeit, während der gesamte C-Terminus nur eine 24-58% Identität der Aminosäure-Sequenz und eine 36-69% Ähnlichkeit aufweist. Weiterhin wurde eine phylogenetische Analyse dieser CIPKs mit PAUP 4.0 durchgeführt. Dabei wurde neben den 17 CIPKs auch NAF-Domänen-besitzende Kinasen aus anderen Pflanzenspezies als auch SNF-artige-Kinasen wie aus der Hefe ScSNF1, Akin10 aus *A. thaliana* und RnAMPK aus Ratten in die Untersuchung mit einbezogen. In Abb. 17 wird der entstandene phylogenetische Stammbaum dargestellt. Aus diesem Stammbaum wird deutlich, dass die NAF-Domänen-besitzenden Protein-Kinasen eine klar abgegrenzte, monophyletische Gruppe innerhalb der SNF-artigen Protein-Kinasen bilden.

Zusammengefasst ergaben diese Untersuchungen, dass die CBLs und CIPKs ein komplexes System bestehend aus 10 Kalzium-Sensoren und 25 mit diesen interagierenden Protein-Kinasen in *Arabidopsis* bilden. Diese Komplexität führt zu der Frage, welche Mechanismen wirken, um nun zu einer möglichen Spezifität zu führen, und welche Funktionen die verschiedenen CBLs und CIPKs in *A. thaliana* inne haben.



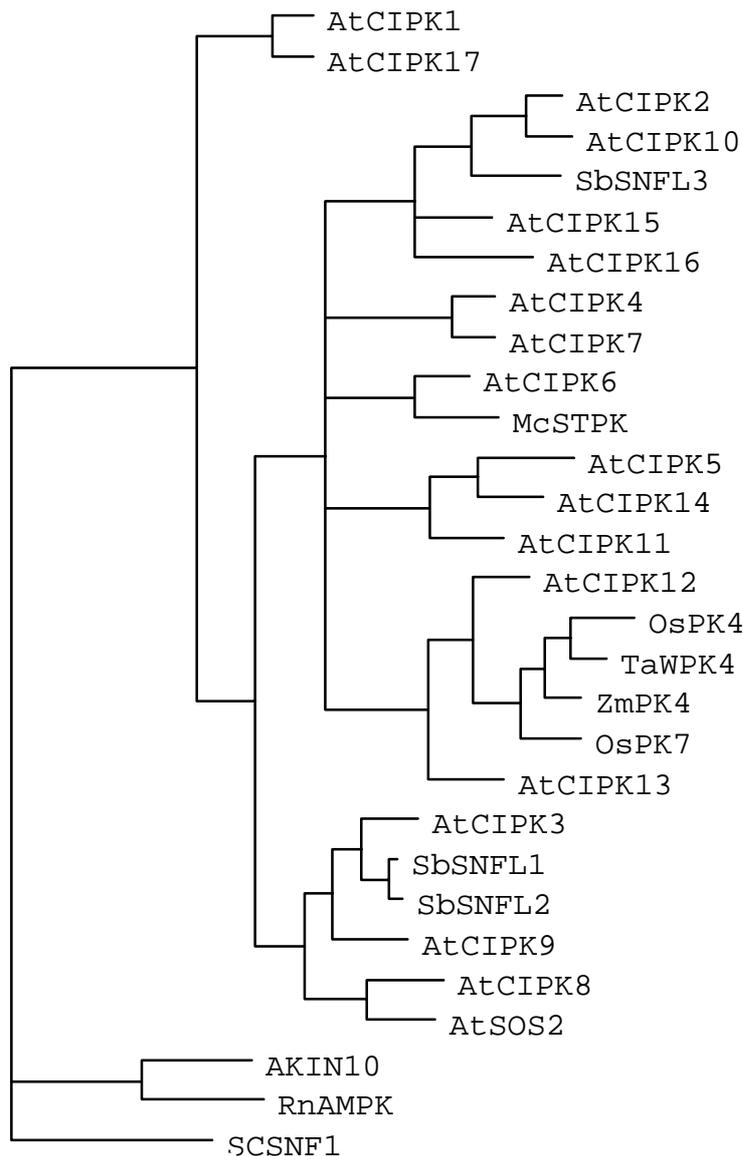


Abb. 17: Phylogenie der AtCIPKs, sowie NAF-Kinasen aus anderen Pflanzenarten. Verwendet wurden die in dieser Arbeit isolierten CIPKs. Als Außengruppe wurden die SNF-artigen Kinasen aus Hefe ScSNF1 (Protein-Zugangsnummer NP010765), die RnAMPK aus Ratte (Q09137) und Kin10 (Q38997) aus *A. thaliana*, benutzt. Die phylogenetische Analyse wurde mit PAUP 4.0 durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass die NAF-Domänenbesitzenden Protein-Kinasen eine klar abgegrenzte, monophyletische Gruppe innerhalb der SNF-artigen Kinasen darstellt.

Abb. 16: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der AtCIPKs. Verwendet wurden die in dieser Arbeit isolierten CIPKs. Für die Erstellung des Alignments wurde der CLUSTAL-Algorithmus im DNASTAR benutzt. Konservierte Aminosäuren, die in mehr als der Hälfte der Kinasen vorkommen, sind mit schwarzen Boxen unterlegt. Rechts werden die Aminosäuren-Positionen angegeben. Bindestriche wurden benutzt um das Alignment zu verbessern.

#### 4.1.6 Die AtCBLs und AtCIPKs interagieren spezifisch miteinander

Aufgrund der großen Anzahl an unterschiedlichen AtCBLs und AtCIPKs drängte sich die Frage auf, ob alle AtCBLs aufgrund der NAF-Domäne mit allen AtCIPKs interagieren oder ob es eine Interaktionsspezifität von bestimmten AtCBLs und AtCIPKs gibt. Um diese Fragestellung zu untersuchen wurde wiederum der Zwei-Hybrid-Ansatz gewählt und die Stärke der Interaktionen anhand des Wachstums auf Selektionsplatten ohne Histidin in verschiedenen Verdünnungen der Hefekultur analysiert (Tropftest). Dieser Versuch wurde mit AtCBL1 bis AtCBL6 und den AtCIPKs 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13 und 14 durchgeführt. Dabei wurde ein eindeutig spezifisches Interaktionsmuster zwischen den verschiedenen AtCBLs und AtCIPKs erkennbar. So interagiert z.B. AtCBL1 nur mit AtCIPK1, 2, 9 und AtCIPK11, während AtCBL2 und AtCBL3 keine eindeutigen Präferenzen bei den untersuchten AtCIPKs zeigten (Abb. 18). Für AtCBL4 und AtCBL6 wurde unter den analysierten AtCIPKs kein Interaktionspartner identifiziert. AtCBL5 interagiert spezifisch mit AtCIPK2 und AtCIPK11.

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Studien zeigten, dass sich ein spezifisches Interaktionsmuster zwischen den unterschiedlichen AtCBLs und AtCIPKs ergibt. In einem weiteren Versuch wurde nachgeprüft, ob aufgrund der sehr hohen Ähnlichkeit in der Aminosäure-Sequenz zwischen AtCBL1 und AtCBL9 (89% Identität) ein identisches Interaktionsverhalten zu erkennen ist. Dazu wurden die beiden AtCBLs mit 23 AtCIPKs (mit Ausnahme von AtCIPK3 und AtCIPK10) in Hefen transformiert und die Interaktionsstärken durch Wachstum auf selektiven Platten anhand von Verdünnungsreihen (Tropftest) ermittelt. Als interagierend wurden jene Proteinpaare gewertet, bei denen die Hefen auch in der dritten Verdünnung (1:100) wachsen. Dabei wurde ein prinzipiell ähnliches Interaktionsverhalten zwischen AtCBL1 und AtCBL9 mit den untersuchten Kinasen aber auch Unterschiede in den Interaktionsstärken bei einzelnen Proteinpaaren festgestellt (verg. Abb. 19). So interagieren zwar beide Kalzium-Sensor-Proteine mit den AtCIPKs 1, 4, 5, 8, 18 und 24 in einer im Tropftest nachweisbar ähnlichen Stärke, aber eine eindeutige Interaktion von AtCBL1 mit AtCIPK7 und 17 zeigte AtCBL9 nicht, während AtCBL9 mit AtCIPK16, 20 und 23 stärker interagiert, als es für CBL1 festgestellt wurde.

Die hier festgestellte Interaktionsspezifität legt nahe, dass selbst wenn verschiedene Reize zeitlich und räumlich parallel ablaufen die beobachtete charakteristische Komplexbildung zur Erzeugung der erforderlichen Signalspezifität beitragen kann.

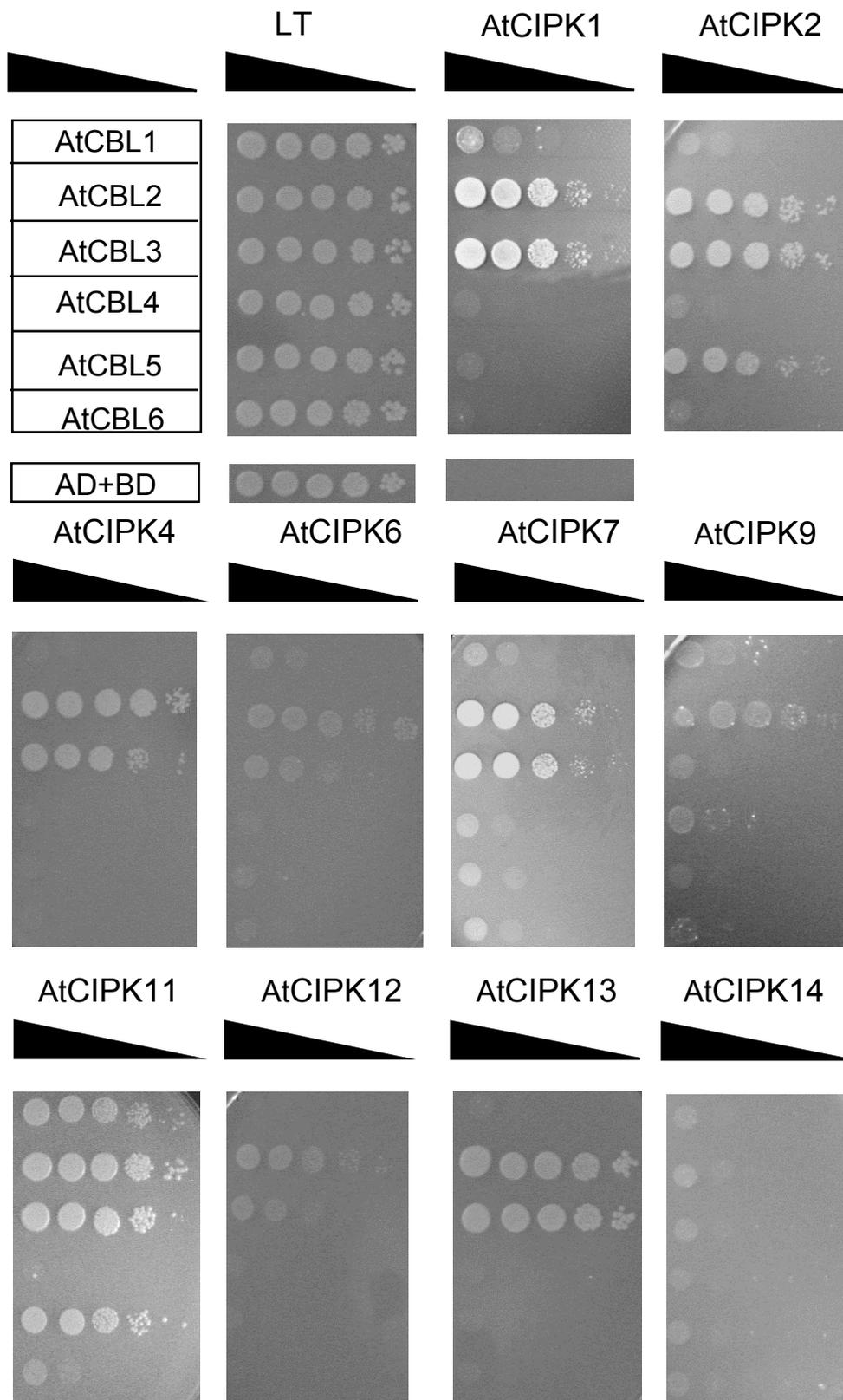


Abb. 18: Spezifische Bildung von CBL-CIPK-Komplexen im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Hefen, die die angegebenen Proteine exprimieren, wurden zur Untersuchung der Interaktionen dieser Proteine in Verdünnungsreihen von 1:10 ausgehend von  $OD_{600}$  bei 2,0 auf Histidin-freiem Medium (LTH) ausplattiert. LT zeigt ein Beispiel der Wachstumskontrolle mit Selektion auf Anwesenheit der beiden Vektoren. Die verschiedenen untersuchten CIPKs zeigen ein eindeutiges Interaktionsmuster mit bestimmten CBL-Proteinen.

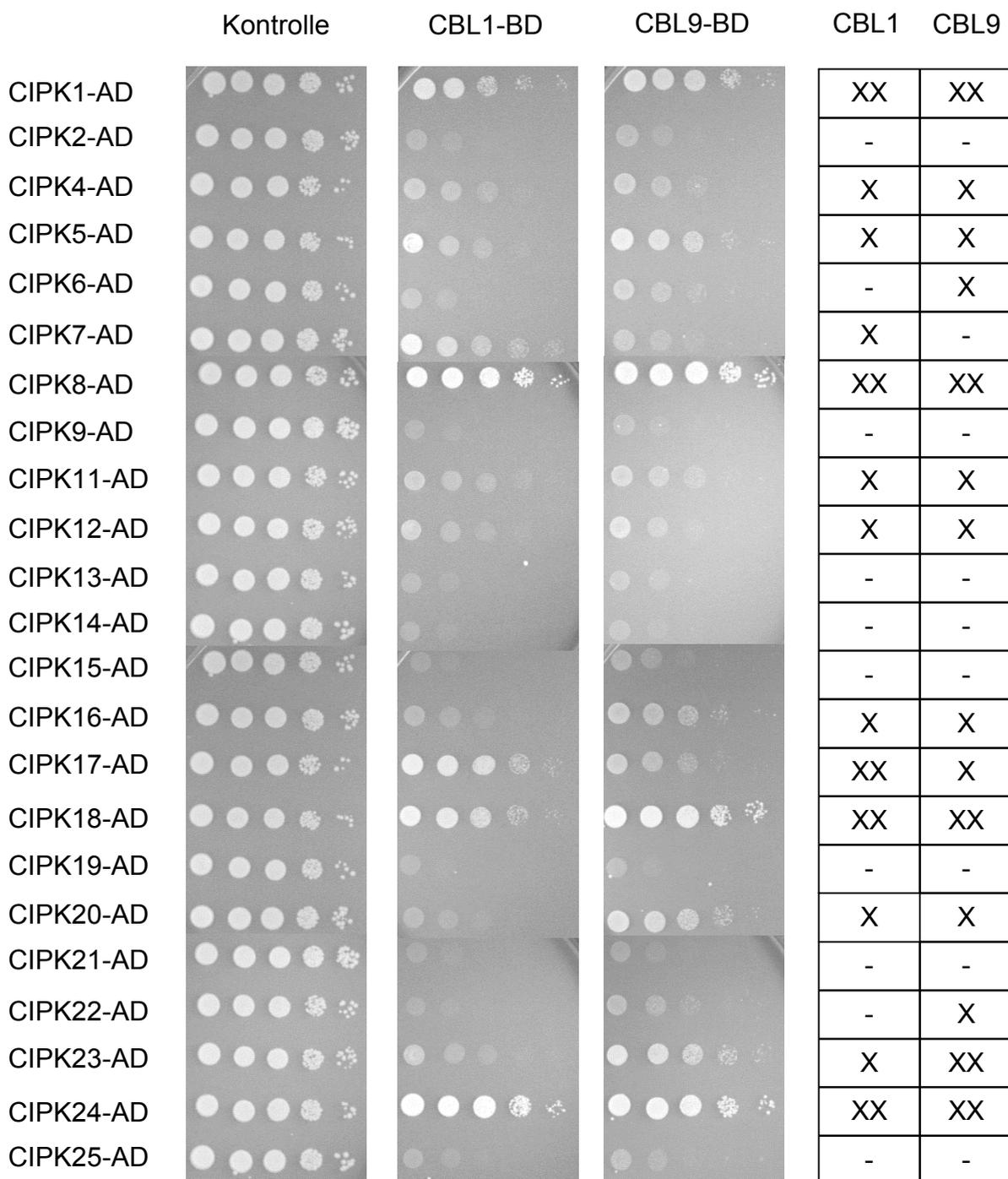


Abb.19: Interaktionsanalyse von AtCBL1 und 9 mit den Kinasen CIPK1 bis 25 (Ausnahme von AtCIPK3 und AtCIPK10) im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Die Wachstumskontrolle wurde auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt, die Selektion auf Interaktion auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin mit 25 mM 3AT. Zur Bestimmung der Interaktionsstärke wurden die Hefen in einer Verdünnungsreihe von 1:10 ausplattiert. Trotz großer Ähnlichkeiten in der Aminosäure-Sequenz zwischen den beiden untersuchten CBL-Proteinen weisen beide ein zwar ähnliches aber für sie spezifisches Interaktionsmuster mit bestimmten Kinasen auf. X: Interaktion; XX: starke Interaktion der Hefen; -: keine Interaktion.

#### 4.1.7 Analyse der Promotor-Regionen der AtCBLs und AtCIPKs

Expressionsmuster und die Regulation der Transkription der AtCBLs und AtCIPKs ist für die überwiegenden Zahl dieser Proteine bisher noch unbekannt. Eine Datenbank-Analyse zur Ermittlung konservierter regulatorischer Promotor-Elemente kann aber Hinweise darauf liefern, die darauffolgend experimentell getestet werden können. Als Promotor-Region wurden die 2 kb vor dem Startcodon bezeichnet mit Ausnahme von AtCBL7, bei dem sich nur 900 bp zwischen dem Startcodon und dem vor dem Gen liegenden AtCBL3 befinden. Die verwendete Analyse erlaubt die Identifizierung verschiedener experimentell verifizierter Promotor-Elemente. So bindet an das CTR/DRE-Motiv das DREB-Protein (drought responsive element binding) in Antwort auf Kälte und Trockenheit (Zhu, 2002). Ebenso sind Elemente und Motive bekannt, die bei Jasmonsäure („MeJA-responsive elements“), ABA (ABRE-Motiv, G-Box), Trockenheit (CAAT-Box) oder bei Zucker ("Sugar-responsive") die Transkription nachfolgender Gene beeinflussen. Andere Elemente (Myc-Motiv, Myb-Motiv) lassen auf die Art von regulierenden Transkriptionsfaktoren schließen. Das Vorhandensein dieser verschiedenen Motive wurde in DNA-Sequenz-Analysen der Promotoren im MapDraw des DNASTAR-Programmes untersucht. In Tab. 4 wird die Anzahl der gefunden Motive für die Promotoren der CBLs in Tab. 5 die der CIPKs dargestellt. So zeigt die Promotor-Region von AtCBL1 neben mehreren Myc-Motiven sowohl zwei CTR/DRE-Motive als auch zwei Motive für die Antwort auf Jasmonsäure, ebenso wie fünf CAAT-Boxen, die aus der Promotor-Region des stressinduzierten RD29A bekannt sind. Myc-Motive sowie CAAT-Boxen und MeJA-Motive konnten ebenfalls in der Promotor-Region von AtCIPK1 ermittelt werden. Zusätzlich weist die Promotor-Region von AtCIPK1 noch eine Myb- und ein Zucker-Antwort-Motiv auf. Auffällig bei den analysierten Promotoren der CBLs scheint, dass nur der Promotor von CBL4 ein ABRE-Motiv aufweist. Auch bei den Promotoren der CIPKs taucht dieses Motiv nur selten auf. Eine mögliche Expressionsregulation durch Zucker, die durch das Zucker-"Responsive"-Motiv angedeutet wird, ist bei den CBLs nur bei CBL4, 8 und 9 sowie bei neun der CIPKs zu erkennen.

Motiv Name	Myc	Myb	CRT/DRE	ABRE	"MeJa- responsive"	CAAT- Box	"Zucker- responsive"
CBL1	8	-	2	-	2	5	-
CBL2	4	1	2	-	2	3	-
CBL3	7	3	-	-	4	1	-
CBL4	3	-	-	1	-	1	2
CBL5	7	1	-	-	-	1	-
CBL6	6	-	-	-	1	1	-
CBL7	3	-	-	-	1	-	-
CBL8	7	1	-	-	1	3	1
CBL9	2	-	-	-	1	4	1

Tab. 4: Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindemotive in den Promotor-Regionen der AtCBLs.

Angegeben wird die jeweilige Anzahl der in den Promotor-Region gefundenen Bindemotive der einzelnen CBLs. Auf die einzelnen Motive sowie die Beeinflussung der Transkription in Antwort auf welche Reize wird unter 4.1.7 eingegangen. Die Analyse wurde im MapDraw des DNASTAR-Programmes durchgeführt.

Motiv Name	Myc	Myb	CRT/DRE	ABRE	"MeJa- responsive"	CAAT- Box	"Zucker- responsive"
CIPK1	5	1	-	-	2	2	1
CIPK2	9	-	1	-	2	1	-
CIPK3	3	1	-	-	1	1	-
CIPK4	12	-	-	-	1	-	1
CIPK5	5	1	1	-	1	1	1
CIPK6	7	-	1	-	2	1	-
CIPK7	7	-	1	-	1	5	-
CIPK8	5	-	-	-	2	5	-
CIPK9	8	1	-	1	4	2	1
CIPK10	8	-	2	-	3	5	-
CIPK11	9	-	1	-	1	1	1
CIPK12	13	-	1	-	1	1	1
CIPK13	1-	-	1	-	1	1	-
CIPK14	8	1	-	-	1	1	-
CIPK15	6	2	1	-	3	1	1
CIPK16	5	2	-	-	2	3	-
CIPK17	3	-	-	-	-	1	-
CIPK18	7	1	-	-	1	3	-
CIPK19	9	-	1	-	-	4	2
CIPK20	3	1	-	1	1	-	2
CIPK21	5	1	-	-	1	2	-
CIPK22	6	-	1	1	6	-	1
CIPK23	7	-	-	1	1	1	-
CIPK24	4	1	3	-	-	4	-
CIPK25	4	-	2	-	1	3	-

Tab. 5: Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindemotive in den Promotor-Regionen der AtCIPKs.

Angegeben wird die jeweilige Anzahl der in den Promotor-Region gefundenen Bindemotive der einzelnen Kinasen. Auf die einzelnen Motive sowie die Beeinflussung der Transkription in Antwort auf welche Reize wird unter 4.1.7 eingegangen. Die Analyse wurde im MapDraw des DNASTAR-Programmes durchgeführt.

---

Expressionsmuster einzelner Proteine können durch das Reportergen Glucuronidase (GUS) sichtbar gemacht werden. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit ebenfalls gewählt, um das Expressionsmuster und die Lokalisation der Expression der Proteine von CBL1 und CIPK1 in transgenen Pflanzen zu untersuchen. Dazu wurden die 5'UTR-Bereiche beider Gene in die Klonierungen mit einbezogen, wobei bei CBL1 einmal das ungespleißte (CBL1prom<sub>gen</sub>) und einmal der modifizierte 5'UTR-Bereich (CBL1prom<sub>c</sub>) für die Analysen verwendet wurde. Bisher liegen nur vorläufige Expressionsdaten aus der T1-Generation der transgenen Pflanzen von CBL1prom<sub>c</sub>-pGPTV.BAR und CIPK1prom-pGPTV.BAR vor. Die in einem Vergleich der Expressionsmuster von AtCBL1 und AtCIPK1 deutlich werdenden Unterschiede wurden anhand der Lokalisation und Intensität der GUS-Aktivität an den Pflanzen festgestellt (vergl. Abb. 20). So erkennt man bei CBL1 eine leichte Blaufärbung aufgrund der GUS-Aktivität in den Wurzeln und im Blatt, nicht aber in den Fortpflanzungsorganen der Pflanze. Wurden die Pflanzen dagegen kälte- (4°C, 1/2 Stunde) oder wärmebehandelt (37°C, 1/2 Stunde), so wurde die Intensität der Blaufärbung nicht nur stärker, was auf eine erhöhte Expression hindeutet, sondern die Aktivität der Glucuronidase wurde auch im Stengelbereich, den Kelchblättern und den Abscissionszonen der Schoten erkennbar. Bei AtCIPK1 war dagegen eine Lokalisation der GUS-Aktivität in den Wurzeln und in geringerer Intensität auch im Blattbereich zu erkennen. Eine leichte Expression von AtCIPK1 war noch in den Pollenkörnern zu erkennen. Diese Expression wird weiterhin durch eine Wärmebehandlung der transgenen Pflanzen verstärkt. Bei einer Kältebehandlung dagegen liessen sich keine Unterschiede in der Expression von CIPK1 im Vergleich zur unbehandelten Pflanze erkennen.

Anhand den vorläufigen Promotor-GUS-Analysen scheint eine gleichzeitige Expression von AtCBL1 und AtCIPK1 nur in den Wurzeln und im Blattbereich stattzufinden, wobei die Expression in beiden Fällen bei Hitze gesteigert wird. Bei AtCBL1 ist zusätzlich eine Expression bei Kälte sichtbar, die bei AtCIPK1 nicht zu erkennen ist. Dies lässt vermuten, dass das CBL1-Protein bei einem Kälte-Reiz über eine andere Kinase als CIPK1 das entsprechende Signal weitergibt.

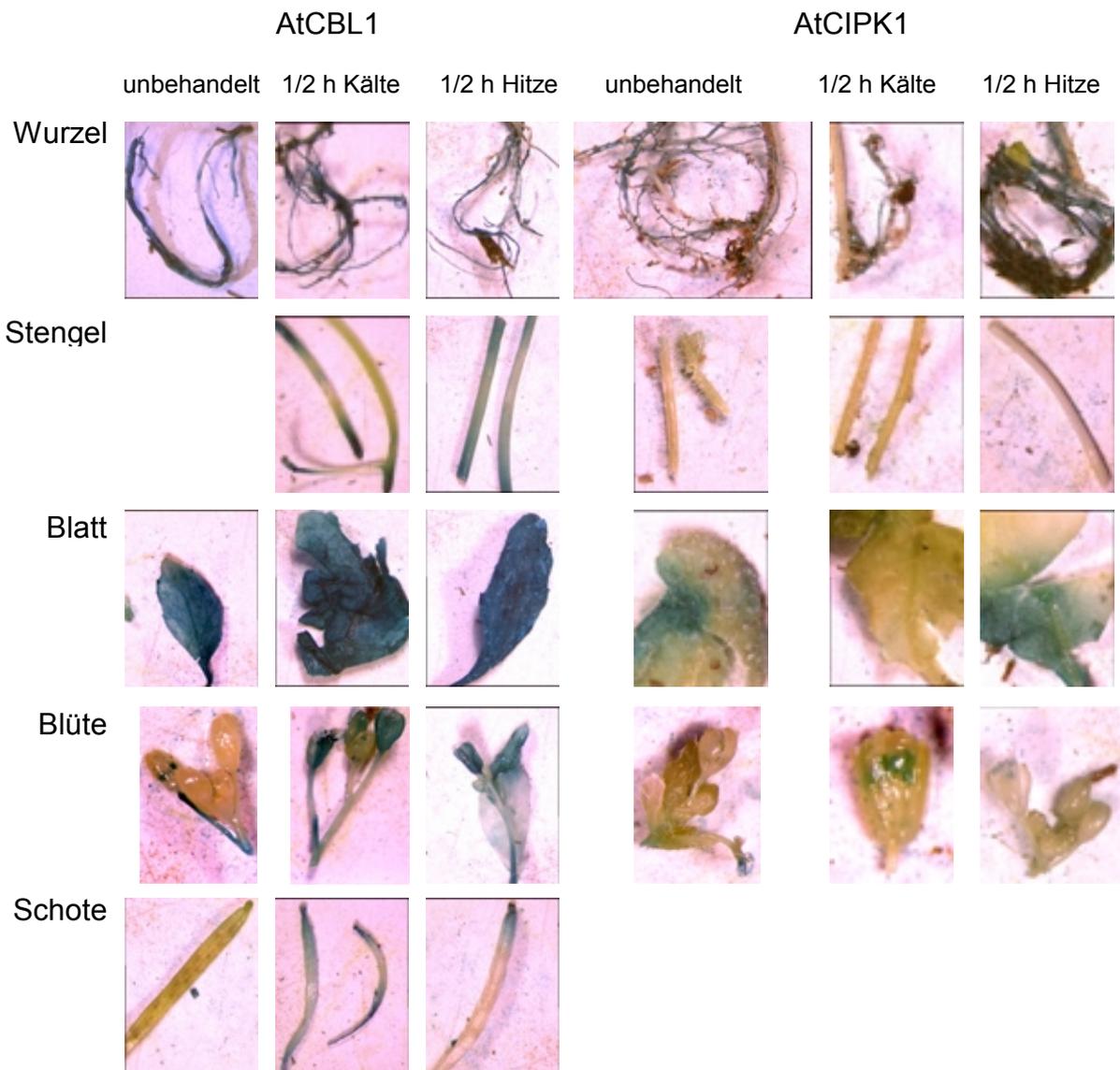


Abb. 20: Vorläufige Expressionsanalysen von AtCBL1 und AtCIPK1 anhand der Glucuronidase-Aktivität in den Promotor-GUS-Pflanzen der T1-Generation. CBL1-prom-GUS-Linien zeigen sowohl bei Kälte als auch bei Wärmebehandlung eine stärkere Glucuronidase-Aktivität in Wurzel, Stengel und Blättern als bei einer GUS-Färbung an unbehandelten Linien. Eine deutliche Induktion des GUS-Genes in der Wurzel ist auch bei den CIPK1prom-GUS-Linien im Anschluß an eine Wärmebehandlung feststellbar.

---

## 4.2 Molekulare Analyse des Response Regulators AtARR2

In einer Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Klaus Harter an der Universität Freiburg wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion des Typ B Response-Regulators ARR2 aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Dieses Protein wurde in früheren Analysen als ein vor allem in Pollen exprimierter Transkriptionsfaktor identifiziert, das die Transkription verschiedener mitochondrialer Komplex I-Gene reguliert (Lohrmann *et al.*, 2001). Schwerpunkt dieser Arbeit war vor allem die Isolierung und Analyse einer *arr2*-Mutante.

### 4.2.1 Isolation und Charakterisierung der *arr2*-Mutante.

In Datenbankanalysen der von der Arbeitsgruppe von Sundaresan erzeugten Insertionsmutanten (Parinov *et al.*, 1999), bei denen die flankierenden Sequenzen von Insertionen des Ds-Transposons bekannt sind, wurde eine solche Ds-Insertion entweder in oder nahe bei dem ARR2-Gen festgestellt (Zugangsnummer Z97340, Liniennummer SGT4387). Aus 20 *Arabidopsis*-Pflanzen dieser Linie wurde an isolierter gDNA PCRs mit den entsprechenden Primern des Transposons Ds3-2 und Ds5-2 und den Genprimern ARR2-S1 und ARR2-A1 in allen vier möglichen Kombinationen durchgeführt. Dabei wurden vier Pflanzen identifiziert, die eine Insertion in dem Gen ARR2 besaßen. Zur Untersuchung der Homo- und Heterozygotie in Bezug auf die Transposon-Insertion wurden PCR-Analysen an der gDNA durchgeführt. Bei Erhalt von PCR-Amplifikaten mit den beiden Genprimern ist das Wildtyp-Allel im Genom enthalten. Zeigt sich dagegen kein PCR-Produkt mit dieser Primerkombination so handelt es sich bei der analysierten Pflanze wahrscheinlich um eine homozygote Pflanze in Bezug auf die Ds-Insertion. Als Gegenkontrolle wurde an der DNA derselben Pflanzen PCRs mit Ds5-2 und ARR2-A1 durchgeführt, bei denen der Erhalt eines PCR-Produktes die Anwesenheit des Transposons im Gen anzeigt. Als Kontrolle wurde *Landsberg erecta* (Ler) als der der Linie zugrunde liegende Ökotyp verwendet. Anhand dieser PCR-Analysen konnte die Linie *arr2-A2* als homozygote Linie identifiziert werden (vergl. Abb. 21B). Die bei den PCR-Analysen mit Genprimer und Transposonprimer erhaltene Fragmente wurde in den Xcm-Vektor kloniert und sequenziert. Bei der Sequenzanalyse der flankierenden Regionen wurde als Ort der Transposon-Insertion die Position 56 im ersten Exon des

---

ARR2-Genes identifiziert (vergl. Abb. 21A). Um nicht nur die Homo- und Heterozygotie zu untersuchen, sondern auch die Anzahl der Insertionen zu ermitteln, wurde eine genomische Southern-Analyse an der gDNA von *arr2-A2* und Ler sowie einer heterozygoten Linie durchgeführt, wobei die DNA mit den Enzymen BamH I, EcoR I und Hind III verdaut wurde. Für die Hybridisierungen wurden eine genspezifische Sonde für ARR2 und eine spezifische Sonde für das Transposon verwendet. Wie in Abb. 21C zu erkennen ist, enthält die Linie *arr2-A2* nur eine Transposon-Insertion, die in dem Gen ARR2 liegt.

Da in vorhergegangenen Expressionsanalysen von ARR2 das Protein hauptsächlich in den Blüten und dort im speziellen in Pollen exprimiert werden (Lohrmann *et al.*, 2001), wurde aus den Blüten von *arr2-A2* und Ler RNA isoliert und nach einer reversen Transkription mit spezifischen Genprimern die Anwesenheit von mRNA des ARR2-Genes durch RT-PCR untersucht. Auch nach 40 Zyklen wurde an der aus den Blüten der Mutante isolierten RNA kein Produkt von ARR2 nachgewiesen (vergl. Abb 22). Als cDNA-Kontrolle wurde TubulinB verwendet. Der *arr2*-Mutante fehlt aufgrund der Transposon-Insertion das ARR2-Protein.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass eine Transposon-Insertionsmutante mit einer Insertion im ARR2-Gen identifiziert und isoliert wurde, die nur eine Insertion aufweist welche zu einem kompletten Ausfall der Funktion von ARR2 führt.

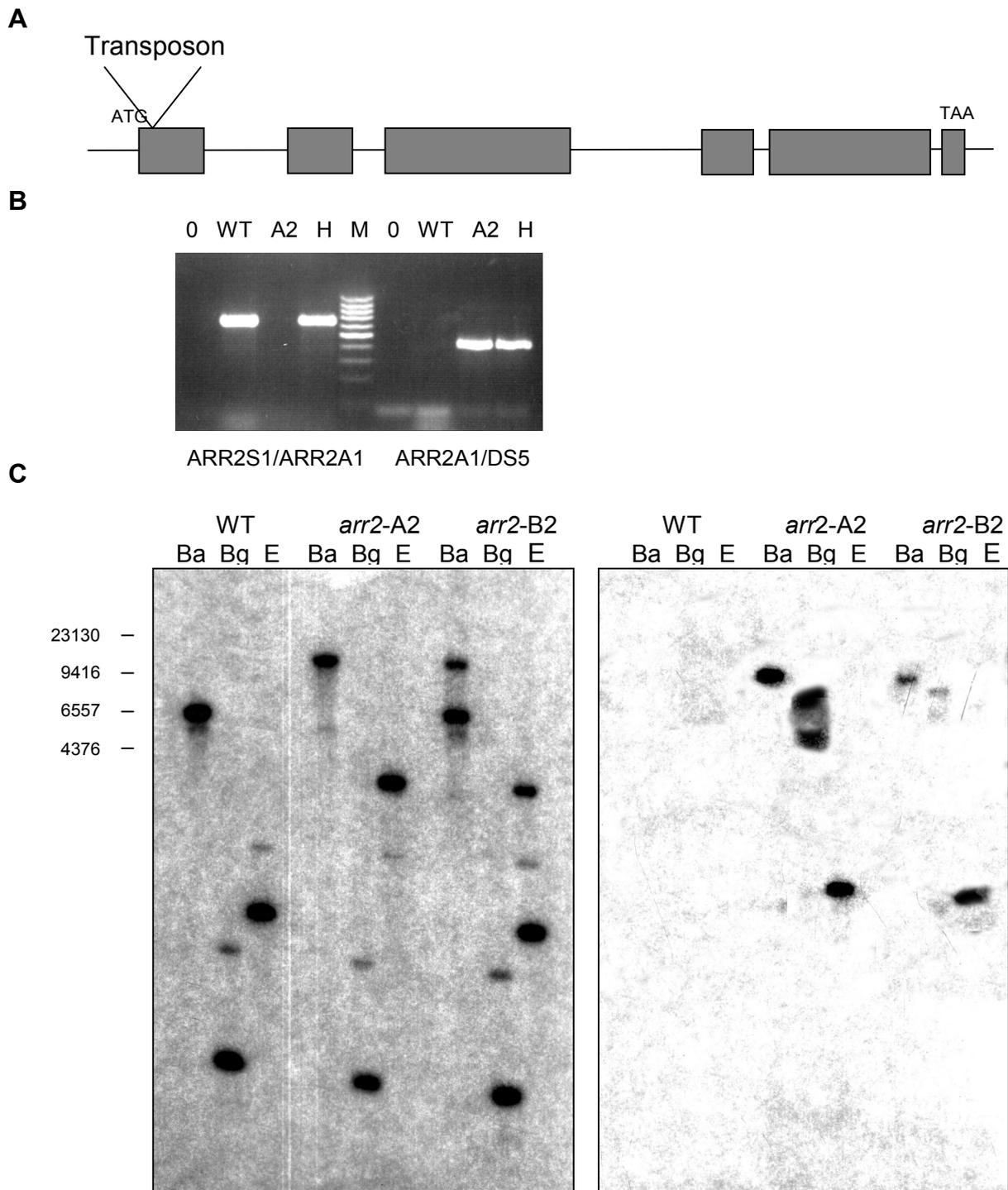


Abb. 21: Genomische Analyse der Transposon-Insertion im ARR2-Gen.

A) Position der Transposon-Insertion im ARR2-Gen. B) PCR an genomischer DNA zur Analyse der Homo- und Heterozygotie in Bezug auf die Transposon-Insertion. Die Linie *arr2-A2* ist homozygot auf die Ds-Insertion. C) Genomische Southern-Analyse zur Feststellung der Homo- oder Heterozygotie in Bezug auf die Insertion sowie der Anzahl der Ds-Insertionen. Die homozygote Linie *arr2-A2* weist nur eine Ds-Insertion auf. WT: Landsberg erecta; A2: *arr2-A2*; H: heterozygote Linie; Ba: BamH I; Bq: Bgl II; E: EcoR I.

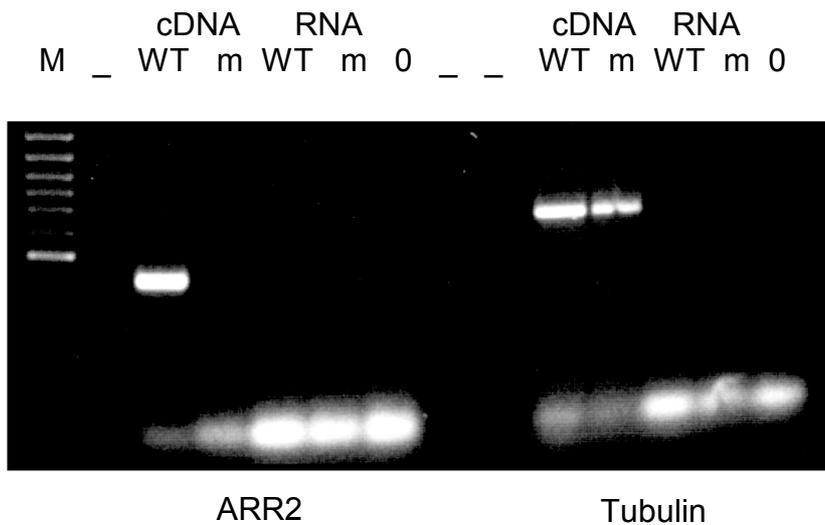


Abb. 22: Expressionsanalysen anhand der RT-PCR zur Untersuchung der Expression von ARR2 in den Blüten der Mutante. Als cDNA-Kontrolle wurde die Expression von Tubulin untersucht. Zur cDNA-Spezifität der Primer wurde eine RNA-PCR-Kontrolle durchgeführt. Die von der *arr2*-Mutante aus Blüten isolierte RNA weist auch nach 40 Zyklen kein ARR2-PCR-Produkt auf. WT: Landberg erecta; m: *arr2*-Mutante; 0: Pufferkontrolle.

In der Kopplungsanalyse nach Kreuzung der *arr2*-Mutante mit dem Wildtyp wurde nach der Selbstung der heterozygoten F1-Generation eine 3:1-Segregation der Pflanzen der F2-Generation in Bezug auf die im Transposon enthaltene Kanamycin-Resistenz festgestellt. Auch diese Ergebnis belegt, dass ein Transposon-Insertionsereignis im Genom dieser Linie stattgefunden haben.

Veränderung in der Morphologie und Physiologie in der Mutante können aufgrund der Ergebnisse auf den Funktionsverlust des ARR2-Genes zurückgeführt werden.

#### 4.2.2 Phänotypische Analyse der *arr2*-Mutante

Die isolierte *arr2*-Mutante wurde im Folgenden phänotypisch analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp *Landsberg erecta* ist bei der *arr2*-Mutante ein verzögerter und kleinerer Wuchs erkennbar (vergl. Abb. 23A). Ebenfalls wurde in den Blüten der Mutante festgestellt, dass die normalerweise im Wildtyp genau festgelegte Anzahl der Antheren von sechs auf fünf reduziert wurde. Weiterhin zeigt sich am Gynoeceum ein leicht verdickter Wuchs des Griffels, der in den Schoten noch deutlicher zutage tritt (vergl. Abb. 23C). Am auffälligsten sind aber die hellen Flecken auf den Blättern jüngerer Pflanzen, die durch Nekrosenbildung hervorgerufen werden (vergl. Abb. 23B). Diese Nekrosenbildung zeigt sich vor allem an den im juvenilen Stadium der Pflanze gebildeten Blättern. Um die Ursache der Nekrosenbildung genauer zu untersuchen wurden verschiedene Färbemethoden angewandt, die die unterschiedlichen Aspekte einer möglichen Ursache dieses Absterbens von Zellen verdeutlichen können. Dazu wurden Blätter von sechs Wochen alten Pflanzen analysiert. Schon im ungefärbten Zustand sind diese Nekrosen auf den Blättern deutlich zu erkennen (vergl. Abb. 24). Die Untersuchung der Autofluoreszenz unter UV-Beleuchtung zeigte eine Akkumulation polyphenolischer Komponenten in den toten Zellen. Ler-Blätter von gleichaltrigen Pflanzen wiesen keine solche Autofluoreszenz auf. Dass die Zellen in den Nekrosen tote Zellen sind, wurde nach einer Färbung mit Lactophenol-Trypanblau sichtbar. Der Farbstoff kann nicht durch die Zellwände lebender Zellen eindringen und färbt daher nur die toten an. Auch hier wird deutlich, dass die älteren Blätter im Gegensatz zu den jüngeren Blättern oder denen des Wildtypes eine Vielzahl an toten Zellen – und damit blaugefärbter Bereiche – aufweisen. Mit einer weiteren Nachweismethode, der DAB-Färbung (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), kann die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in Zellen untersucht werden. Dabei führen die Sauerstoffradikale zu einem bräunlichen Farbumschlag. Die Analyse der Blätter der *arr2*-Mutante zeigte diesen Farbumschlag in den Randbereichen der Nekrosen. Als weiterer chemischer Nachweis der Nekrosen wurde die Kallosebildung analysiert. Diese kann durch Anillinblau-Färbung im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden. Eine deutliche Fluoreszenz in den nekrotischen Bereichen des Blattes aufgrund der Kallose war bei der *arr2*-Mutante sichtbar, die in den Blättern des Wildtypes nicht erkennbar war.

Die Insertion des Ds-Transposons in das *ARR2*-Gen führt zu pleiotropischen Effekten, die in einem kleineren Wuchs, Veränderungen im Blütenaufbau sowie zur

Nekrosenbildung zu erkennen sind. Analysen dieser Nekrosen zeigten, dass diese Bereiche aus toten Zellen bestehen, die Akkumulationen von Polyphenolen und Kallose aufweisen. Ebenfalls konnte in den Randbereichen der Nekrosen Bildung von Peroxiden festgestellt werden. Wird die *arr2*-Mutante dagegen unter sterilen Bedingungen gezogen so zeigen sich keine Nekrosen auf den Blättern (Klaus Harter, persönliche Mitteilung), dies deutet darauf hin, dass diese Pflanzen empfindlich ist gegenüber ansonsten nicht pathogene Mikro-Organismen im Boden.

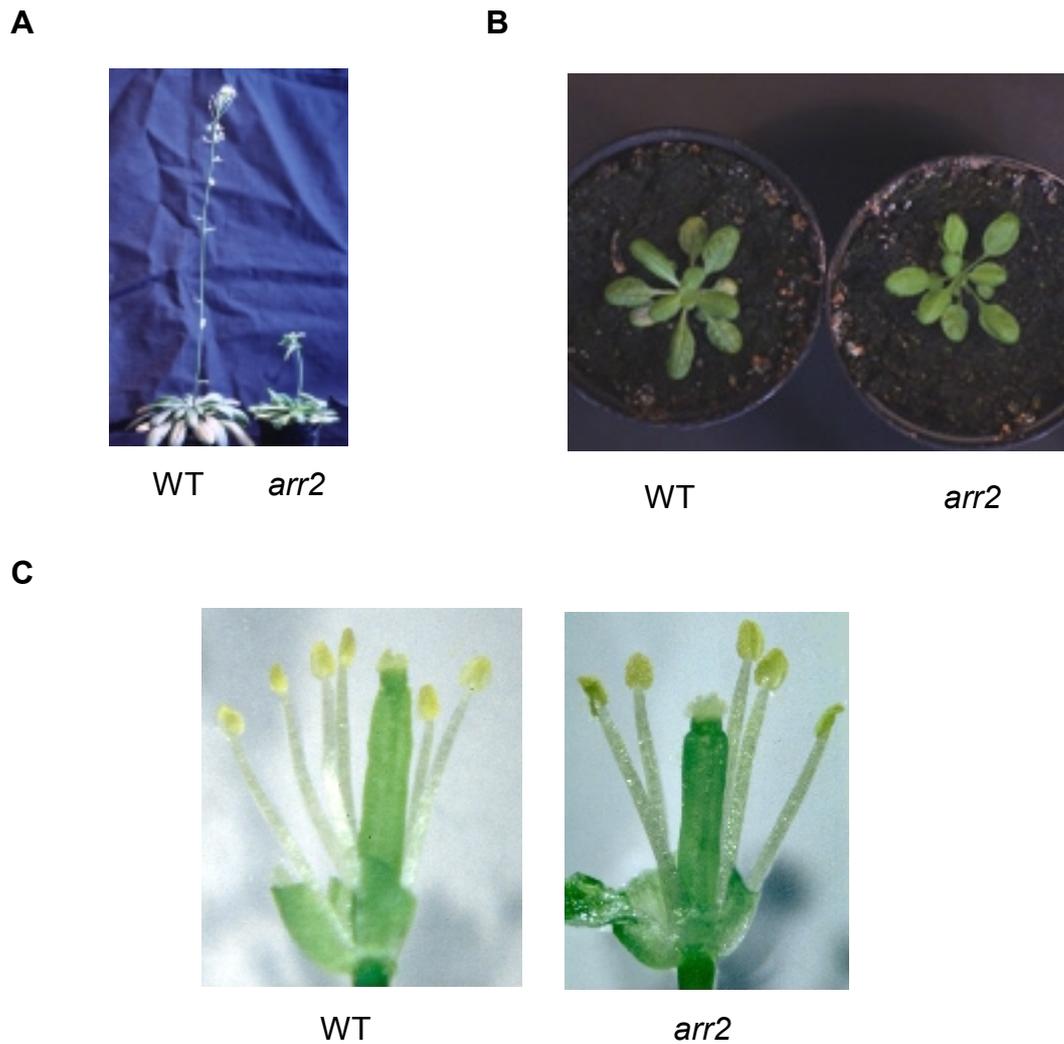
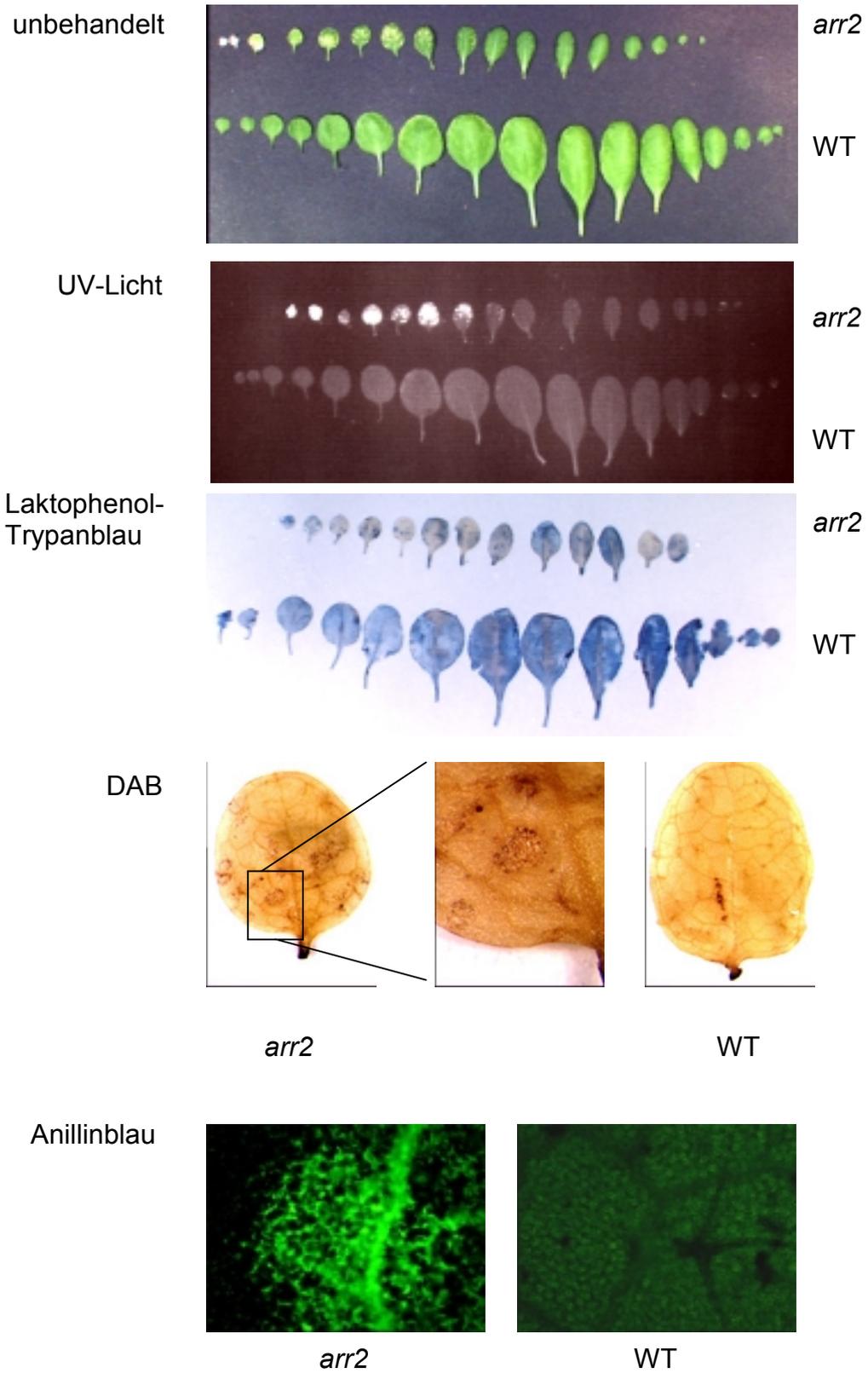


Abb. 23: Darstellung der Phänotypen der *arr2*-Mutante im Vergleich zum Ökotyp *Landsberg erecta*.

A) Vergleich von Wildtyp und der *arr2*-Mutante. Die acht Wochen alte unter Kurztagsbedingungen gezogene *arr2*-Pflanze zeigt einen deutlich retardierten Wuchs gegenüber dem Wildtyp. B) Darstellung der Nekrosen auf den Blättern der 6 Wochen alten *arr2*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. C) Vergleich im Blütenaufbau der *arr2*-Mutante und Wildtyp. Erkennbar sind die verringerte Anzahl an Staubblättern als auch der verdickte Wuchs des Gynoeceums. WT: *Landsberg erecta*.



---

Abb. 24: Analyse der Nekrosenbildung an Blättern von sechs Wochen alten Pflanzen. Blätter der sechs Wochen alte Pflanzen von *arr2* zeigten deutliche Nekrosenbildung im Gegensatz zu Blättern gleich alter Pflanzen von *Landsberg erecta*. Nachweis der Akkumulation von Polyphenole in den Nekrosen zeigte unter UV-Licht deren Autofluoreszenz in den Blättern der *arr2*-Mutante. Durch Färbung mit Lactophenol-Trypanblau wurde deutlich, dass es sich bei den Nekrosen bei den *arr2*-Blättern um tote Zellen handelt. Rund um die Nekrosen wurden durch die DAB-Färbung die Anwesenheit von Peroxiden deutlich. Die Kallose-Bildung der nekrotischen Zellen wurde bei der Anillinblau-Färbung unter Fluoreszenzlicht sichtbar.

In Freiburg von Jens Lohrmann durchgeführte Analysen zeigten, dass die *arr2*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp unempfindlich gegenüber der Wirkung der Hormone Ethylen und Cytokinin ist. Da Ethylen ein wichtiger Botenstoff und bekanntes Hormon in der Signalleitung ist, wurde die Mutante auf ihre Antworten gegenüber verschiedenen Stressreizen untersucht. Dabei waren vor allem Reize wie Salz und Austrocknung untersucht worden. Dafür wurden acht Wochen alte Pflanzen entweder mit 100 mM NaCl gegossen oder erhielten kein Wasser (Austrocknung). In dieser Versuchsanordnung zeigte sich auch nach mehreren Wiederholungen sowohl bei Trocken- als auch bei Salzstress, dass *arr2*-Pflanzen deutlich toleranter gegenüber diesen Reizen sind wie der Wildtyp (vergl. Abb. 25).

Der Ausfall der Response-Regulators ARR2 führt zu pleiotropischen Effekten sowohl in der Morphologie als auch in der Hormon-Antwort der Pflanze.

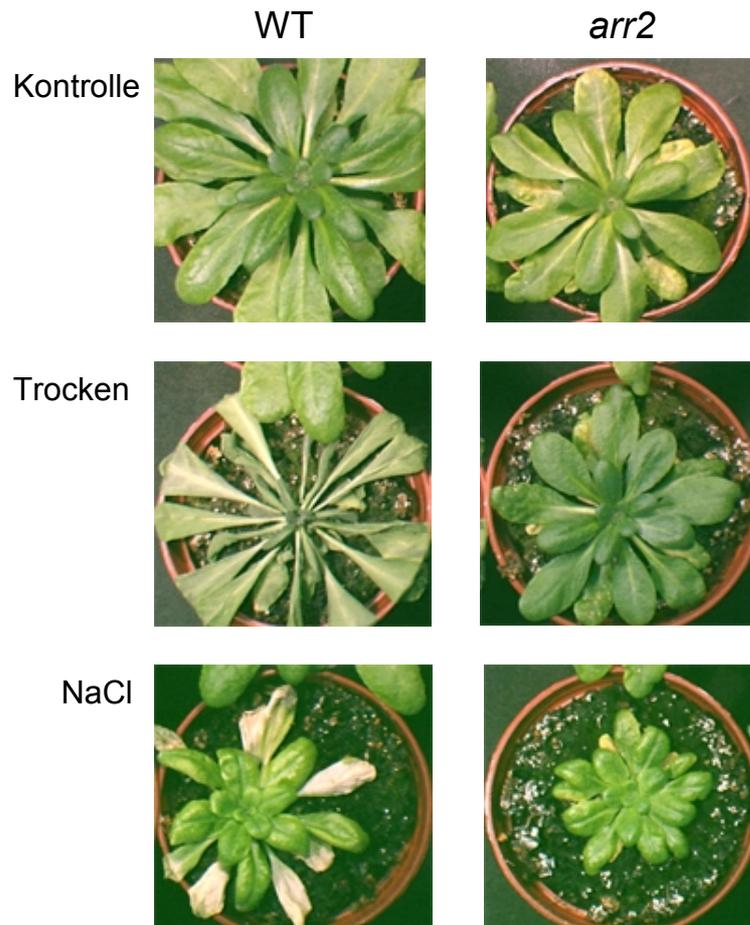


Abb. 25: Vergleich acht Wochen alter *arr2*-Pflanzen mit dem Wildtyp unter den Stressbedingungen Austrocknung und Salz. Dazu wurde den Pflanzen entweder Wasser vorenthalten oder sie wurden mit 100 mM NaCl gegossen. Nach einer Woche starben die Wildtyp-Pflanzen aufgrund der Austrocknung oder zeigten sich anfällig gegenüber dem Salz, während die *arr2*-Pflanzen insensitiver gegenüber diesen Reizen waren.



## 5 Diskussion

### 5.1 Kalzium-Sensoren und deren interagierende Protein-Kinasen

Eine Beteiligung von Kalzium-Ionen in der Signaltransduktion in Pflanzen von verschiedenen Umweltreizen wie Kälte, Trockenheit, Hitze, Salz oder Pathogenbefall ist durch zahlreiche Untersuchungen experimentell belegt (Malhó, 1999; Bowler und Fluhr, 2000; Knight und Knight, 2001; Larkindale und Knight, 2002; Sanders *et al.*, 2002). Es sind in der Pflanze inzwischen verschiedene Ebenen der Regulation identifiziert worden, die dazu beitragen Kalzium-Signale spezifisch weiterzuleiten. Zu diesen gehören sowohl die Lokalisation der Kalzium-Freisetzung in der Zelle, Magnitude und Kinetik der Signale als auch die Weitergabe dieser Signale durch spezifische Proteine, die dieses Ion binden (Knight und Knight, 2001; Sanders *et al.*, 2002). Mehrere Proteinfamilien von Kalzium-Sensoren sind identifiziert worden, deren gemeinsame Eigenschaft die Bindung von Kalzium-Ionen ist (Luan *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002). Zu diesen pflanzlichen Kalzium-Sensoren werden die Familien der CDPKs (calcium-dependent protein kinases), der Calmoduline und der CBL-Proteine (Calcineurin B-like) gezählt. Die in dieser Arbeit bearbeiteten Proteine der zuletzt erwähnten Familie zeigen große Ähnlichkeiten zur Calcineurin B Untereinheit und zu neuronalen Kalzium-Sensoren (Kudla *et al.*, 1999). Durch Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen wurde eine neue Gruppe von Protein-Kinasen als CBL-Interaktoren identifiziert, die als CIPKs (CBL-interacting protein-kinase) bezeichnet werden (Shi *et al.*, 1999). Diese CIPKs gehören zur Gruppe der SNF-ähnlichen (Sucrose non fermenting) Serin-Threonin-Protein-Kinasen. Die Interaktion von CBL1 mit CIPK1 ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, wobei eine Mangan-Abhängigkeit bei der Autophosphorylierung von CIPK1 festgestellt wurde (Shi *et al.*, 1999). In Untersuchungen mit einem Mitglied derselben Proteinfamilie, SOS2/CIPK24, wurde dagegen eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit für die Autophosphorylierung festgestellt (Halfter *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). Im inaktivierten Zustand von SOS2/CIPK24 interagieren der N- und C-Terminus miteinander. Erst durch die Bindung des Kalzium-Sensors SOS3/CBL4 werden beide Domänen voneinander getrennt und dadurch die aktiven Zentren der Kinase freigegeben (Guo *et al.*, 2001). Eine ähnliche Aktivierung der Kinase wird auch durch die Interaktion von CBL1 mit CIPK1 vermutet. Daraus lässt

sich folgendes Modell herleiten (vergl. Abb. 26): das CBL1-Protein wie auch das CIPK1-Protein liegen unaktiviert in der Zelle vor, wenn kein äußerer Reiz anliegt. Dabei interagieren der N- und C-Terminus der Kinase miteinander und inhibieren dabei die Kinase-Domäne. Kommt es aufgrund eines äußeren Reizes zur Kalzium-Freisetzung, wird CBL1 durch die Bindung von Kalzium-Ionen aktiviert und bindet an CIPK1. Durch diese Bindung werden die beiden Termini voneinander getrennt und damit die Kinase-Domäne freigelegt. Erst durch die Bindung des CBL1-Proteines an CIPK1 kann die Kinase die entsprechenden Targets regulieren.

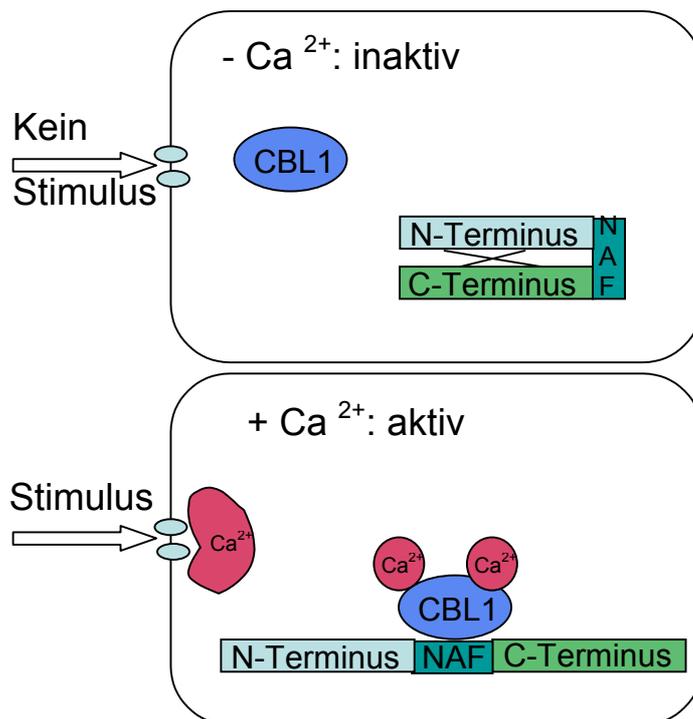


Abb. 26: Modell der Interaktion von AtCBL1 und AtCIPK1.

Im unstimulierten Zustand interagieren der N- und C-Terminus miteinander, so dass die Kinase-Domäne inhibiert ist. Erst nach der Kalzium-Freisetzung durch einen externen Stimulus kommt es zu einer Interaktion des AtCBL1-Proteines mit AtCIPK1, die Kinase-Domäne wird freigelegt und damit die Kinase aktiviert.

Um die Funktion dieser Proteine *in planta* zu analysieren, wurden in dieser Arbeit T-DNA-Insertionsmutanten sowohl im Gen von CBL1 als auch von CIPK1 identifiziert. Beide Mutanten stellen komplette Null-Allele mit jeweils einer Insertion in der codierenden Region des Genes dar. Unter normalen Wachstumsbedingungen lassen sich beide Mutanten anatomisch nicht von Wildtyp-Pflanzen unterscheiden. Bei der Analyse der etiolierten Keimlinge in den Hypokotylenassays wurde eine verringerte

Streckung der Hypokotylen der *cb11*-Keimlinge im Vergleich zu den *cipk1*- und Wildtyp-Keimlingen deutlich. Die Tatsache, dass CBL1 durch Licht induziert werden kann (Nozawa *et al.*, 2001), könnte auf eine Funktion in der Samen-Keimung hindeuten, da ein Verlust dieses Proteins anscheinend zu einer leicht verzögerten Keimung der Samen führt. CIPK1 scheint nicht in diesem Signalweg involviert zu sein. Weiterhin wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber Trockenheit als auch Hitze bei beiden Mutantenlinien in jungen Pflanzen festgestellt. Aufgrund dieser Übereinstimmung in der Reaktion auf diese beiden Reize, erscheint es wahrscheinlich, dass beide Proteine in Signalwegen, die diese Reize vermitteln, beteiligt sind.

Ebenso wurde eine erhöhte Sensitivität der *cb11*-Mutante gegenüber NaCl festgestellt, die *cipk1*-Mutante scheint dagegen gegenüber diesem Salz toleranter zu sein. Andere Salze wie LiCl oder KCl und Mannitol scheinen die Hypokotylenstreckung beider Mutanten nicht stärker als beim Wildtyp zu beeinflussen. Das deutet darauf hin, dass die osmotische Wirkung von NaCl nicht für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Ebenso hat auch das Lithium-Ion keine Wirkung auf die Hypokotylenstreckung der beiden untersuchten Mutantenlinien. Der durch den Funktionsverlust der CBL1- und CIPK1-Proteine verursachte Phänotyp ist somit Natrium-spezifisch. Damit ist eine Beteiligung beider Proteine bei der Signaltransduktion von Natrium-induzierten Reizen sehr wahrscheinlich. In einer anderen Mutante der CBL-Familie, *SOS3/cbl4*, sowie einer CIPK-Mutante, *SOS2/cipk24*, wurden ebenfalls erhöhte Sensitivität gegenüber NaCl festgestellt, wobei hier deutlich auch das Lithium-Ion ähnliche Wirkungen hervorruft (Liu und Zhu, 1998). Dies deutet darauf hin, dass diese Proteine in anderen Signalwegen beteiligt sind als CBL1 und CIPK1.

Obwohl CBL1 bei Kälte deutlich in der Expression induziert wird, wurden bei Kälte-Behandlungen bei beiden Mutanten-Linien bisher noch keine physiologischen Effekte nachgewiesen (Ralph Bock, persönliche Mitteilung). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass andere Proteine beider Familien ähnliche Funktionen haben und somit den Ausfall von CBL1 oder CIPK1 kompensieren. Andererseits können die bisher angewandten Bedingungen des Kältereizes nicht ausreichen, um physiologische Effekte in den Mutanten phänotypisch nachzuweisen. Physiologische Veränderungen bei Trockenheit und Hitze sind bisher nur an zwei Wochen alten Keimlingen, jene bei Anwesenheit von Salz aber an adulten Pflanzen festgestellt

---

worden. Sowohl Trockenstress als auch Salzstress sind entwicklungsabhängig, da die Toleranz in einem Stadium der Entwicklung anders sein kann als in einem anderen (Borsani *et al.*, 2001). Deshalb müssen in weitergehenden Untersuchungen diese Reize auch an Pflanzen in beiden Entwicklungsstadien wiederholt werden.

Veränderungen der Sensitivität auf bestimmte Reize kann aufgrund von Unterschieden in der Bereitstellung von Osmoprotektanten zurückzuführen sein. So kommt es bei Salz-, Kälte- oder Trockenstress zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten, die sowohl die membrangebundenen Strukturen als auch Makromoleküle angreifen (Holmberg, 1998). Osmoprotektanten können einen Schutz vor diesen Angriffen bilden und zur Aufrechterhaltung des Turgors beitragen. Zu diesen Osmoprotektanten gehören Aminosäuren wie Prolin oder auch Glycin-Betaine, Dimethylsulfoniopropionate als auch Zuckerpolyole wie Mannitol oder Trehalose (Nuccio *et al.*, 1999). Synthese-Proteine wie P5CS, ein Enzym zur Prolin-Synthese, oder Transkriptionsfaktoren wie DREB2 liefern Hinweise auf die Produktion solcher Osmoprotektanten und gelten deshalb als Markergene (Knight *et al.*, 1997; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). Inwieweit die Expression dieser und weiterer Markergene durch die Mutation im CBL1- oder CIPK1-Gen betroffen sind, könnte mit Hilfe von Northern- oder RT-PCR-Analysen festgestellt werden. Dieser Ansatz könnte auch die Frage beantworten, warum die *cb1-1*-Mutante bei Salzstress sensitiver, die *cipk1*-Mutante dagegen insensitive ist.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Antwort der beiden Mutanten auf NaCl wäre, dass CIPK1 ein negativer Regulator in der Salzstress-Antwort ist. Eine zweite Möglichkeit wäre dagegen, dass CBL1 durch die Bindung an ein CIPK1 normalerweise die Salzstress-Antwort vermittelt. Durch den Ausfall von CBL1 fehlt dem CIPK1-Protein der Interaktionspartner, der ihn durch die Bindung aktiviert. Damit ist diese Signaltransduktionskette unterbrochen - es kommt zur höheren Sensitivität gegenüber Salz. Anders scheint die Erklärung für den Ausfall von CIPK1 zu sein, bei dem nun die Signalweiterleitung von CBL1 bei Salzstress zwar normal verläuft, nun aber der Interaktionspartner fehlt, mit dem die Signalkette normalerweise weitergeleitet wird. Da mehrere CIPKs wahrscheinlich um die Bindung mit dem CBL1-Protein konkurrieren, kann der Ausfall des CIPK1-Proteins zu einem veränderten Gleichgewicht in diesem Konkurrenzkampf führen (vergl. Abb. 27). Es könnte also sein, dass das CBL1-Protein nun mit einem anderen CIPK-Protein interagiert, wie zum Beispiel die ebenfalls mit CBL1 interagierende SOS2/CIPK24.

Dabei wird aber möglicherweise eine Signalkaskade induziert, die eine erhöhte Konzentration von Schutzproteinen zur Folge hat, so dass die *cipk1*-Mutante nun insensitiver gegenüber dem Salz zu sein scheint. Bei Trockenheit und Hitze scheint diese Signalweiterleitung über ein anderes Protein nicht zu funktionieren, weshalb in diesem Fall die *cipk1*-Mutante wie die von *cb1* reagiert. Um diese Vermutung zu verifizieren, müsste nicht nur die Doppelmutante von *cb1/cipk1* genauer untersucht werden, sondern auch die inzwischen hergestellten Überexpressionslinien. Ein weiterer Hinweis, wie die einzelnen Signalkaskaden weiterverlaufen, würden Kreuzungen der beiden Mutanten mit anderen bekannten, in Stressantworten involvierten Mutanten bringen.

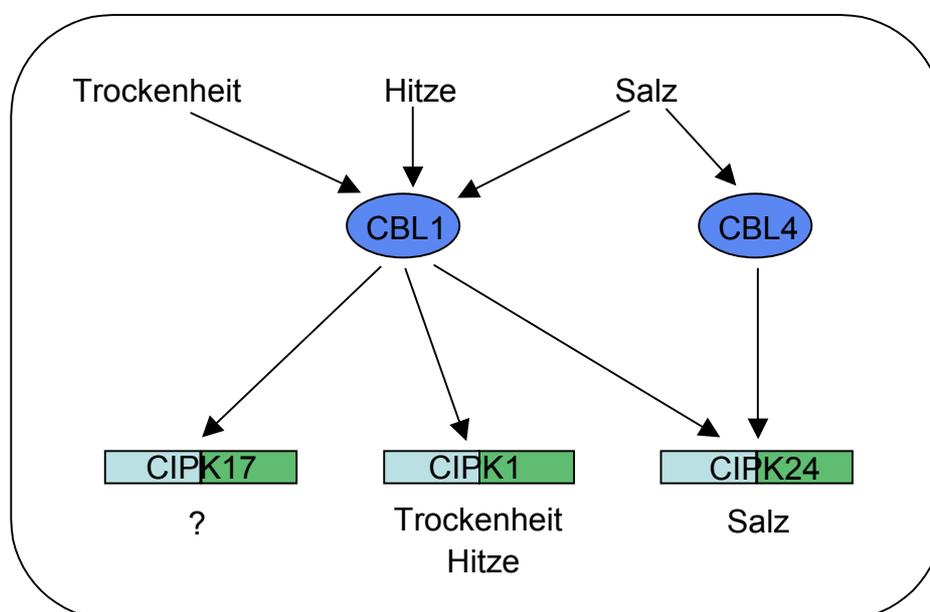


Abb. 27: Modell der Signalweiterleitung verschiedener abiotischer Reize über AtCBL1 und AtCBL4.

Anhand dieses Modelles wird deutlich, dass ein komplexes Netzwerk zur Regulation der Signalweiterleitungen über verschiedene CBL-Proteine durch Interaktion mit unterschiedlichen CIPKs aufgebaut wird. CBL1 interagiert mit mehreren CIPKs, die wahrscheinlich um diese Bindung kompetitieren. Ein Ausfall einer dieser Kinasen führt folglich zu einem Ungleichgewicht und verändert damit die Signalkette.

Um den Signalweg weiter zu verfolgen, ist es notwendig, diejenigen Proteine zu identifizieren, die von den CIPKs reguliert werden. In dem Mutanten-Screen für die Isolierung der „salt overly sensitive“-Mutanten wurde eine weitere Mutante, SOS1, isoliert, deren mutiertes Gen für einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter kodiert (Zhu *et al.*, 1998). An diesen Antiporter scheint SOS2/CIPK24 zu binden und diesen zu regulieren (Shi *et al.*, 2002). Für CIPK1 müssen die Target-Proteine noch identifiziert und verifiziert

---

werden. Obwohl zwischen den einzelnen CBLs und CIPKs teilweise hohe Homologien auftreten, kann aufgrund der veränderten Reaktionen der beiden untersuchten Mutanten bei Hitze-Behandlung und Trockenheit davon ausgegangen werden, dass es kaum Redundanzen gibt. Obwohl ein Netzwerk durch die CBL- und CIPK-Proteine aufgebaut wird, ist der Signalweg der einzelnen CBLs und CIPKs dermaßen spezifisch, dass es kaum vorkommt, dass andere Proteine derselben Familie bei einem Ausfall dieselbe Funktion übernehmen kann. Dies wird vor allem in den Mutantanalysen offensichtlich, wobei die Funktion von CBL1 als ein genereller Kalzium-Sensor bei Stressantworten deutlich wird.

Ob die beobachteten Phänotypen tatsächlich auf den Ausfall des Proteines zurückzuführen sind, müssen die Pflanzen mit dem entsprechenden Gen wieder komplementiert werden. *cb1*-Komplementationspflanzen, in die die cDNA von CBL1 mit vorgeschalteten 35 S-Promotor transformiert wurde, zeigten schon in der T1-Generation einen kleineren Wuchs, der auf Reaktionen wie bei Einfluss von abiotischen Reizen hinweist. Eine Erklärung dafür kann sein, dass durch die konstitutive Expression des CBL1-Proteins aufgrund des 35 S-Promotor eine Überexpression dieses Proteines auftritt. Da CBL1-Proteine in der Signalleitung bei verschiedenen abiotischen Reizen beteiligt sind, kann eine Überexpression zu einer dauerhaften Stressantwort führen. Um diesen Effekt zu umgehen, müssten transgene Pflanzen zur Komplementation hergestellt werden, die entweder die cDNA oder die genomische Sequenz der Genes mit dem CBL1-eigenen Promotor erhalten.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems wurde in dieser Arbeit anhand von Deletionen und gezielt eingeführten Mutationen in der variablen C-terminalen Region von CIPK1 eine 24 Aminosäuren lange Interaktionsdomäne identifiziert, die für die Interaktion mit den CBL-Proteinen wichtig und notwendig ist (Albrecht *et al.*, 2001). Aufgrund der konservierten Aminosäuren Asparagin, Alanin und Phenylalanin wird diese Interaktionsdomäne als NAF-Domäne bezeichnet. Diese NAF-Domäne vermittelte in den Untersuchungen die Interaktion mit den CBL-Proteinen 1 bis 6. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass dieses Modul die Interaktion mit allen CBL-Proteinen vermittelt. Auch die NAF-Domäne einer heterologen Protein-Kinase, SNFL3 aus *Sorghum bicolor* (Sucrose non fermenting like), kann die Interaktion mit CBL-Proteinen aus *A. thaliana* vermitteln (Albrecht *et al.*, 2001). Damit kann davon ausgegangen werden, dass alle Kinasen, die die NAF-Domäne besitzen, aufgrund ihrer Interaktion mit den

CBL-Kalzium-Sensoren in Kalzium-vermittelten Signalkaskaden beteiligt sind. Diese Domäne ist auch in anderen Pflanzen-Arten konserviert. Für diese NAF-Domänen-besitzenden Kinasen aus anderen Pflanzen-Spezies wurde festgestellt, dass ihre Expression durch exogene Faktoren reguliert wird. So wird WPK4 aus Weizen bei Licht, Cytokinin und Nahrungsentzug induziert und ZmPK4 aus Mais in Antwort auf Kälte (Ikeda *et al.*, 1999; Ohba *et al.*, 2000). Die NAF-Domänen-besitzende Familie der Protein-Kinasen besteht in *A. thaliana* aus insgesamt 25 Mitgliedern. Aufgrund ihrer konservierten N-terminalen katalytischen Domäne und dem charakteristischen Interaktionsmodul im C-Terminus werden sie inzwischen zu der Gruppe der SNF-ähnlichen Kinasen (Sucose non fermenting) als eine eigenständige Familie zugeordnet, den SnRK3 (PlantsP, <http://plantsp.sdsc.edu>).

Die 10 identifizierten CBL-Kalzium-Sensoren und 25 CIPKs können durch Interaktionen ein komplexes Netzwerk bilden. Daraus ergibt sich die Fragestellung wie in diesem Netzwerk Spezifität in den Signalsystemen erzeugt wird. Dazu wurden in dieser Arbeit vier Mechanismen identifiziert. Ein Mechanismus zur Erzeugung von Spezifität ist die im Hefe-Zwei-Hybrid-System festgestellte Spezifität in der Interaktion zwischen verschiedenen AtCBLs und AtCIPKs (Kim *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2001). Diese Interaktionsspezifität wird noch offensichtlicher, wenn man das Interaktionsmuster der sich sehr ähnlichen Kalzium-Sensoren CBL1 und CBL9 mit 23 verschiedenen Kinasen untersucht. Durch diese Analysen wurde festgestellt, dass, trotz der hohen Identität der Aminosäure-Sequenzen von 89 %, beide Proteine mit verschiedenen Kinasen in unterschiedlicher Stärke interagieren. So interagiert CBL1 mit CIPK7, CBL9 dagegen nicht, während CBL9 an CIPK20 bindet und CBL1 nicht. Ein weiterer Mechanismus, um Spezifität in der Signalweiterleitung zu erhalten, ist die subzelluläre Lokalisation der Proteine. Vergleicht man die CBLs miteinander auf Proteinebene, so fällt auf, dass von den neun bisher isolierten Proteinen vier eine Myristylierungssequenz im N-Terminus aufweisen. Diese Sequenz deutet auf eine Membran-Lokalisation der Proteine hin (Yalovsky *et al.*, 1999; Ishitani *et al.*, 2000). Tatsächlich wurde eine Membran-Lokalisation von CBL1 in GFP-Fusionsprotein-Untersuchungen nachgewiesen. Dabei zieht die Interaktion von CBL1 mit dem cytoplasmatischen CIPK1 dieses ebenfalls an die Membran. Eine weitere subzelluläre Lokalisation wurde für CBL6 dagegen im endoplasmatischen Retikulum ermittelt (Phil Taylor, persönliche Mitteilung). Da Kalzium je nach Reiz aus verschiedenen Kalzium-Speicher der Zelle freigesetzt wird, können nur jene CBL-

---

Proteine das Kalzium-Signal weiterleiten, die in der Nähe dieser Kalzium-Freisetzung lokalisiert sind. Eine unterschiedliche Induktion der Expression von CBLs und CIPKs stellen eine weitere Möglichkeit der Spezifitätserzeugung dar. Vergleiche der Promotor-Sequenzen der neun isolierten CBLs und 25 CIPKs lassen deutlich unterschiedliche Expression der einzelnen Proteine vermuten und damit eine Beteiligung in unterschiedlichen Signalkaskaden, wie etwa durch Induktion in Antwort auf die Hormone Abscisinsäure oder Jasmonsäure, verschiedener Reize oder Anwesenheit von Zucker. Der letzte zu erwähnende Mechanismus ist die Gewebespezifität innerhalb der Pflanze. So sind CBL1 und CIPK1 vor allem in der Wurzel lokalisiert. CBL1 zeigt aber noch zusätzlich stärkere Expression in den Blättern und im Stengel sowie in den Kelchblättern der Blüte, während CIPK1 nur eine leichte Andeutung von Expression in den Blättern und in den Pollen zeigt. In einer ebenfalls die CIPK-Familie betreffenden Arbeit wurde festgestellt, dass unterschiedliche CIPKs (als PKS bezeichnet) sowohl bei Salzstress verschieden induziert, aber auch an distinkten Stellen (Wurzel oder Trieb) exprimiert werden (Guo *et al.*, 2001).

Anhand der Analyse der *cb1-1*- und *cipk1*-Mutanten sowie der CBL- und CIPK-Proteinfamilien wurden mehrere Mechanismen erkennbar, um Spezifität in der Signalweiterleitung durch Kalzium zu erreichen. So wird Kalzium durch verschiedene Reize an unterschiedlichen Stellen freigesetzt. Durch die diversen Lokalisationen bestimmter Kalzium-Sensor-Proteine in der Zelle kann das Kalzium-Signal jeweils nur bestimmte CBLs aktivieren. Die einzelnen CBL-Proteine interagieren nur mit bestimmten CIPKs und aktivieren diese, wodurch das Signal spezifisch weitergegeben wird. Aufgrund der Promotor-Analysen kann davon ausgegangen werden, dass die einzelnen CBLs und CIPKs unterschiedlich induziert werden, diese Proteine also nur bei bestimmten Reizen in der Zelle anwesend sind. Ebenso wurde eine unterschiedliche Expression einiger CBLs und CIPKs in verschiedenen Geweben der Pflanze festgestellt. Durch die Diversität in der Induktion als auch der Expression der verschiedenen Proteine in der Pflanze treten kaum Redundanzen durch Übernahme der Funktion eines Proteins durch ein anderes Protein derselben Familie auf. Mit diesem System von spezifischen Interaktionen, unterschiedlicher Lokalisation und Expression unter diversen Bedingungen in verschiedenen Geweben wird es ermöglicht, dass dieses Signaltransduktionsnetzwerk gleichzeitig Spezifität

als auch die erforderlichen Wechselwirkungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signaltransduktion erzeugt.

## 5.2 Analyse des Response-Regulators ARR2

Proteine, die aufgrund ihrer Protein-Struktur in Zwei-Komponenten-Systemen beteiligt sein könnten, sind in Pflanzen nachgewiesen worden. Eines dieser Proteine ist der Response-Regulator ARR2, dessen Funktion aber in der Pflanze bisher noch unbekannt ist. Um die Funktion dieses Proteines *in planta* analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit deshalb eine Mutante isoliert und analysiert. Die Ds-Transposon-Insertion verursacht in der *arr2*-Mutante einen Funktionsverlust des ARR2-Proteines. Die Mutation in dem Gen des Response-Regulators führt Phänotypen wie einen verminderten Wuchs, Nekrosenbildung auf den im juvenilen Stadium der Pflanze gebildeten Blättern, eine verminderte Anzahl an Antheren sowie ein verdicktes Gynoeceum. Effekte wie verzögerter Wuchs und Nekrosenbildung sind bisher in Wildtyp-Pflanzen vor allem bei abiotischen und biotischen Reizen beobachtet worden. So ist Nekrosenbildung bei Pathogenbefall beobachtet worden und tritt bei einer hypersensitiven Reaktion (HR) oder durch Zelltod bei einer kompatiblen Reaktion auf (Dietrich *et al.*, 1994; Hilpert *et al.*, 2001). Dabei induziert diese Nekrosenbildung eine systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance, SAR). Unterschiedliche Mutanten, die Pathogenbefall simulieren und spontane Nekrosenbildung zeigen, sind identifiziert und analysiert worden (Dietrich *et al.*, 1994). Dabei wurde festgestellt, dass die Entwicklungsstadien und die Umgebung Einfluss auf die Nekrosenbildung hatten. Diese Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium wird in der *arr2*-Mutante ebenso ersichtlich, da man die Nekrosenbildung nur auf den im juvenilen Stadium der Pflanze entwickelten Blättern nachweisen kann. Ein biochemischer Marker der Nekrosenbildung ist der Aufbau von Kallose (Dietrich *et al.*, 1994; Hilpert *et al.*, 2001). Auch die Blätter der *arr2*-Mutante zeigten nach der Anillinblau-Färbung den biochemischen Nachweis für Nekrosen anhand der Bildung von Kallose. Die Akkumulation von polyphenolischen Komponenten als auch die Anwesenheit von Peroxiden im Randbereich der Nekrosen führten dabei zum Tod der Zellen. Damit war aber noch nicht geklärt, ob es sich dabei um eine spontane Nekrosenbildung handelt oder ob Mikro-Organismen in der Erde eine Rolle spielen und diese induzieren. Bei weitergehenden Analysen, die

---

in der Arbeitsgruppe von Klaus Harter in Freiburg durchgeführt wurden, wurde die Mutante unter sterilen Bedingungen gezogen. Unter diesen Bedingungen zeigten die Blätter keine Nekrosenbildungen, was darauf hindeutet, dass diese Bildung durch nicht-pathogene Mikroorganismen im Boden verursacht werden. Neben der doch sehr auffälligen Nekrosenbildung und den anatomischen Veränderungen bedingt durch die Mutation im ARR2-Gen konnte noch eine erhöhte Toleranz der Mutante gegenüber Salz- und Trockenstress festgestellt werden. Damit weist die Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber der bei Trocken- und Salzstress gebildeten reaktiven Sauerstoffe (reactive oxygen species, ROS) auf, die ebenfalls durch Erzeugung von oxidativem Stress zum Zelltod führen können (Holmberg, 1998; Borsani *et al.*, 2001). Falls durch die Nekrosenbildung die SAR induziert worden ist, sind damit auch schon die Protektanten zur Vermeidung des oxidativen Stresses vorhanden, wie möglicherweise Prolin, ein Radikalfänger (Liu und Zhu, 1998).

Bei Applikation verschiedener Hormone wurde offensichtlich, dass die Mutante in einem Vergleich mit dem Wildtyp insensitiver gegenüber den Wirkungen von Ethylen und Cytokinin ist. So zeigten die etiolierten Keimlinge der Mutante bei Anwesenheit von Ethylen keine der als Triple-Response bezeichneten Effekte, wie kürzeres Hypokotylen-Streckungswachstum, gestörter Geotropismus der Wurzeln oder verzögertes Öffnen des apikalen Hackens (Lohrmann *et al.*, in revision). Ethylen ist ebenfalls dafür bekannt in der Pathogenantwort als auch bei verschiedenen Stressantworten beteiligt zu sein (Chang und Shockey, 1999; Bleecker und Kende, 2000). Somit scheint der Response-Regulator ARR2 in Ethylen-vermittelten Signalwegen in Antwort auf Trockenheit und NaCl beteiligt zu sein. Dies war ein Hinweis, in welchen Signalwegen der Response-Regulator ARR2 beteiligt ist. Die Strukturaufklärung als Response-Regulator deutete auf die Funktion dieses Proteines in einem Zwei-Komponenten-System. Weiteren Untersuchungen in Freiburg ergaben, dass der Response-Regulator ARR2 im Zwei-Hybrid-System mit dem Histidin-Transfer-Protein AHP2 interagiert und damit in einem Drei-Hybrid-System die Interaktion mit der Hybrid-Kinase und Ethylenrezeptor ETR1 vermittelt (Lohrmann *et al.*, in revision). In weiteren Versuchen konnte ein Phosphotransfer von ETR1 über AHP2 auf ARR2 verifiziert werden. Damit ist eine Signalkette parallel zum ETR1-CTR1-EIN2-Ethylen-Signalweg identifiziert worden (Lohrmann *et al.*, in revision). Wahrscheinlich wird ARR2 durch diese Phosphorylierung aktiviert und fungiert dann als aktiver Transkriptionsfaktor (vergl. Abb. 28). Um die bisher nur *in vitro*

nachgewiesene Signalkette des Zwei-Komponenten-Systemes zur Weiterleitung von Ethylen-Signalen zu verifizieren, wurde die arr2-Mutante in mehrere Ethylen-Antwort-Mutanten eingekreuzt, die in Zukunft analysiert werden.

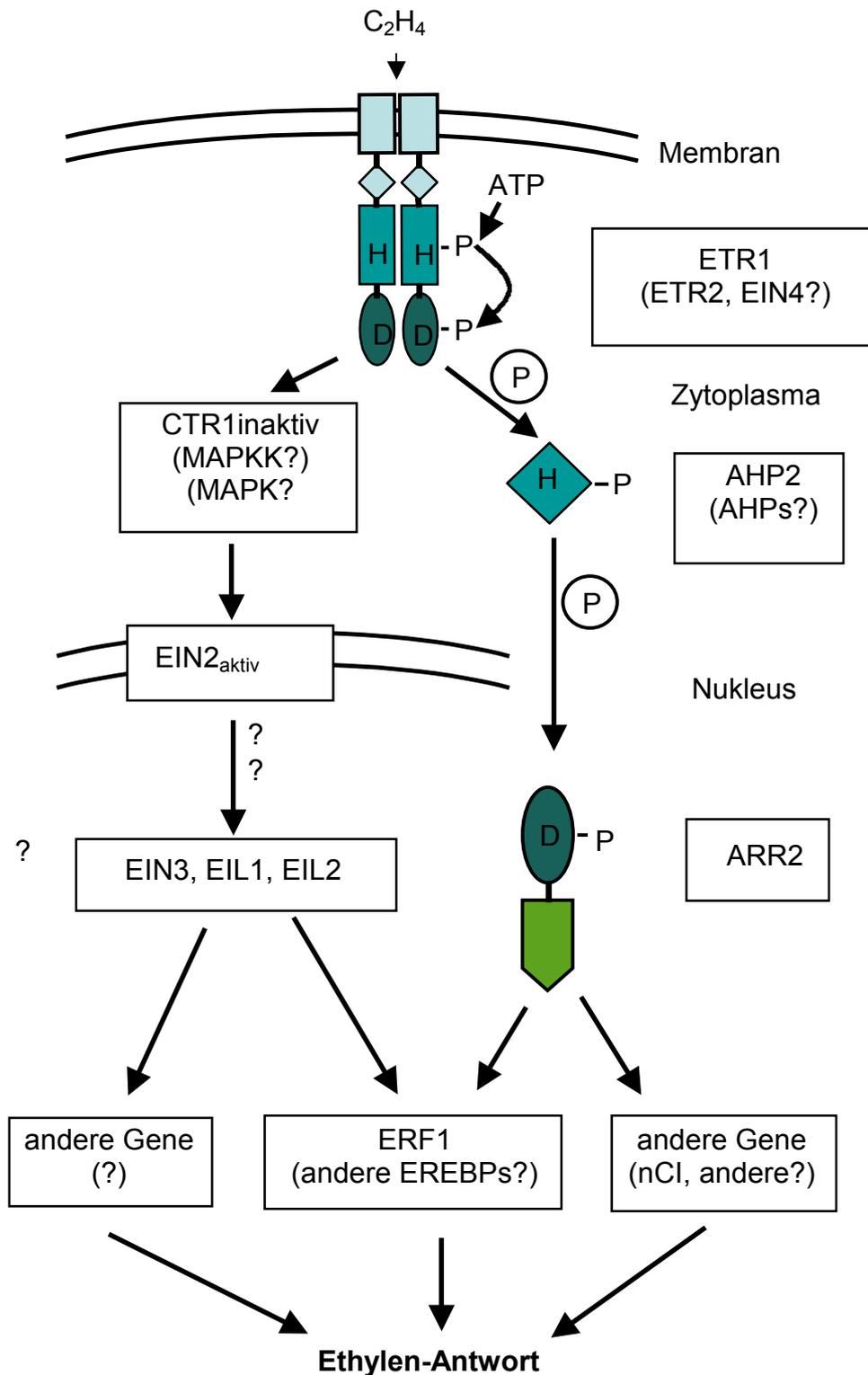


Abb. 28: Erweitertes Modell der Ethylen-Signalwege in *Arabidopsis*.

Nach der Bindung von Ethylen an den Ethylen-Rezeptor ETR1 gehen von diesem zwei unabhängige Signalwege aus. Der eine Signalweg geht über die RAF-ähnliche Kinase CTR1 zu EIN2, das den Transkriptionsfaktor EIN3 aktiviert. Der zweite Signalweg bildet ein Zwei-Komponenten-System, bei dem über einen Phospho-Transfer ARR2 als Transkriptionsfaktor aktiviert wird. D: Aspartat; H: Histidin; P: Phosphat-Gruppe.

---

Eine Funktion des ARR2-Proteines als Transkriptionsfaktor für mitochondriale Komplex I-Gene wurde nachgewiesen (Lohrmann *et al.*, 2001). Dabei bindet ARR2 an ein spezifisches Sequenzmotiv, das aufgrund der Expression der Komplex I-Gene in den Pollenkörnern der Pflanze als Pollenbox bezeichnet wurde. Obwohl der Response-Regulator die Transkription einiger mitochondrialer Komplex I-Gene beeinflusst und die Funktion der Mitochondrien in der Streckung des Pollenschlauches von Bedeutung ist, zeigen die Pflanzen der *arr2*-Mutante einen normalen Fruchtansatz. Die Beteiligung von ARR2 in der Signalkette der Ethylenantworten wurde anhand der Insensitivität der Mutante gegenüber den Wirkungen dieses Hormones ermittelt. Die Regulierung mitochondrialer Gene durch Ethylen war bisher noch unbekannt und durch diese Analysen erstmals in Betracht zu ziehen. Um dies genauer zu analysieren, wurde die *arr2*-Mutante mit Promotor-GUS-Pflanzen der drei mitochondrialen Komplex I-Gene PSST, TYKY und KD55 gekreuzt. Diese Kreuzungen liegen nun in der F1-Generation vor und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Sollte in diesen Doppelmutanten eine GUS-Färbung der Pollen durch das Fehlen des ARR2-Proteines unterbleiben, kann davon ausgegangen werden, dass ARR2 der einzige Transkriptionsfaktor für die Induktion dieser Gene ist.

Mit der Isolierung und Analyse der *arr2*-Mutante ist ein Werkzeug für künftige Forschungen in der Signaltransduktion von Ethylen-Signalen gegeben. Dabei führt die Ds-Insertion in dem ARR2-Gen und der damit verbundene Funktionsverlust zu pleiotropischen Effekten sowohl in der Anatomie als auch der Physiologie der Pflanze. Die Analyse der *arr2*-Mutante führte zur Identifizierung eines neuen Ethylen-abhängigen Signatransduktionsweges in *A. thaliana*. Ebenso eröffnete diese Analyse neue Aspekte der Regulierung mitochondrialer Gene durch Ethylen.



## 6 Zusammenfassung

Die Pflanze hat sich auf sehr effektive Art und Weise an ihr sessiles Leben angepasst. Dazu gehören auch Sensor-Systeme, die verschiedene Reize der Umgebung wahrnehmen und in spezifische Signale innerhalb der Pflanze umwandeln. In dieser Arbeit wurden Elemente zweier neuer Signalweiterleitungssysteme analysiert, die beide in der Weiterleitung und Verarbeitung von Umweltreizen beteiligt sind.

Eines der Signaltransduktionssysteme vermittelt die spezifische Weitergabe von Kalziumsignalen über Kalzium-Sensoren und deren interagierenden Protein-Kinasen. Dabei handelt es sich um die Proteinfamilie der Kalzium-bindenden AtCBLs (Calcineurin B-like) und den mit den CBLs interagierenden AtCIPKs (CBL-interagierende Protein Kinasen). Die Familie der CBLs besteht aus zehn Mitgliedern, von denen neun in dieser Arbeit untersucht wurden, während die CIPKs 25 Mitglieder zählt. In Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen interagieren die Mitglieder beider Proteinfamilien spezifisch miteinander und bilden damit ein komplexes Netzwerk der Signalweitergabe. Die Interaktion wird durch ein 24 Aminosäuren langes Interaktionsmodul der Kinase vermittelt, das als hinreichend und notwendig für die Interaktion identifiziert wurde. Diese Protein-Protein-Interaktionsdomäne wurde aufgrund der konservierten Aminosäuren Asparagin, Alanin und Phenylalanin als NAF-Domäne bezeichnet. Die spezifische Interaktion der Proteine sowie unterschiedlicher Lokalisation innerhalb der Zelle als auch Expression in der Pflanze lässt darauf schließen, dass mit diesem CBL/CIPK-Netzwerk ein System entsteht, das verschiedene Kalzium-Signale spezifisch weiterleitet. Für Kalzium-Signale sind bekannt, dass sie unter anderem in verschiedenen Stressantworten erzeugt werden. In dieser Arbeit wurde anhand von Mutanten-Analysen festgestellt, dass ein Ausfall von AtCBL1 oder AtCIPK1 durch eine T-DNA-Insertion zu drastischen Veränderungen in der Physiologie in Antwort auf verschiedene Reize führt. So sind sowohl die *cb11*- als auch die *cipk1*-Mutante intoleranter gegenüber Trockenheit und Hitze. Auch bei Anwesenheit von Salz zeigte die *cb11*-Mutante, dass sie im Gegensatz zum Wildtyp empfindlicher auf diesen Reiz reagierte, während die *cipk1*-Mutante eher insensibler gegenüber diesem Stress war. Anhand der Messungen der Hypokotylenlängen bei Anwesenheit verschiedener Salze und Zucker zeigte sich, dass die Reaktionen und damit der Signalweg Natrium-spezifisch ist. CBL1 und

---

CIPK1 agieren somit in den Signalwegen bei Trockenheit, Hitze und Salz. Aufgrund dieser Mutanten-Analysen kann davon ausgegangen werden, dass, obwohl teilweise hohe Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen CBLs beziehungsweise CIPKs bestehen, es zu kaum Redundanzen kommt. Die Signale werden also ganz spezifisch von bestimmten CBLs auf bestimmte CIPKs weitergegeben. Dabei scheint CBL1 innerhalb von *Arabidopsis thaliana* ein genereller integrierender Kalzium-Sensor der verschiedenen Umweltreize zu sein.

Ebenfalls in der Vermittlung von Antworten auf Umweltreize beteiligt, ist der Signalweg, in dem der Transkriptionsfaktor und Response-Regulator ARR2 involviert ist. Eine durch die Intergration eines Ds-Transposons im ersten Exon des ARR2-Genes verursachter Ausfall der ARR2-Genfunktion führt dazu, dass die Pflanzen sich nicht nur anatomisch im Wuchs und im Aufbau der Blüte ändern, sondern auch physiologische Veränderungen aufweisen. So kommt es zur Nekrosenbildung auf den im juvenilen Stadium der Pflanze gebildeten Blättern. Diese Mutante weist weiterhin noch eine erhöhte Resistenz gegenüber Salz und Trockenheit auf. Ebenso konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Klaus Harter in Freiburg festgestellt werden, dass diese Mutante insensitiv gegenüber den Pflanzenhormonen Ethylen und Cytokinin ist. Dies ist ein Hinweis in welchen Signalwegen ARR2 beteiligt ist. Tatsächlich wurde in Hefe-Drei-Hybrid-Analysen nachgewiesen, dass ARR2 via dem Histidin-Transfer-Protein AHP2 mit dem Ethylenrezeptor ETR1 interagiert. Dabei wird von dem Rezeptor ausgehend ein Phosphat auf ARR2 übertragen. Diese Form des Phosphotransfers wird als Zwei-Komponenten-System bezeichnet. Ausgehend von der *arr2*-Mutanten-Analyse wurde die Funktion des ARR2-Proteines im Ethylen-Signalweg ermittelt, die zur Identifizierung eines neuen Zweiges dieses Signaltransduktionsweges führten.

Anhand der Mutanten-Analysen und der Interaktionsstudien des CBL/CIPK-Netzwerkes und des Response-Regulators ARR2 wurde in dieser Arbeit die Bedeutung dieser Proteine in der Signalweiterleitung spezifischer Reize deutlich. Dabei wurden verschiedene Mechanismen der Erzeugung von Spezifität in diesen Signalwegen besonders offensichtlich. Ein Ausfall der Proteine führt zu Störungen in der Physiologie der Pflanzen. In weitergehenden Mutanten-Analysen durch Erzeugung von Doppelmutanten soll nun die Komplexität der einzelnen Signalwege weiter analysiert und vielleicht in Zukunft das Netzwerk der Stressantworten vollends identifiziert werden.

## 7 Summary

Plants have evolved effective signaling systems to be adopted to their sessile lives. These systems are necessary to sense and interpret the environmental changes influencing the existence and development of the plant. In this work two novel signal transduction systems of plants have been analyzed.

One of the signal transduction systems mediates the specific transmission of calcium signals. Signal transmission is achieved by calcium sensors and their interacting partners. One type of such calcium sensors are the AtCBLs (Calcineurin B-like), a protein family comprising of ten members in *Arabidopsis thaliana*. These AtCBLs interact with a protein kinase family of 25 members, the AtCIPKs (CBL-interacting protein kinases). The proteins of both families interact in a yeast two-hybrid system in a specific manner. A 24 amino acid domain has been identified to be required and sufficient for the interaction. Factors generating specificity in this system are specific complex formation and the different localizations of the CBLs and CIPKs within the cell as well as a differential expression of the proteins within the plant. Therefore a specific network for signal transduction in various calcium dependent pathways can be postulated. Those calcium signals are known to be generated in response to environmental and biotic stimuli. Indeed, in this work drastic changes in the perception of external stimuli could be analyzed in T-DNA insertion mutants with insertions in the CBL1 gene and in the CIPK1 gene. The insertions in the *cb1* mutant as well as in the *cipk1* mutant render plants more sensitive to drought and heat. Whereas the *cb1* mutant exhibits a higher sensitivity the *cipk1* mutant appears less sensitive to salt. As a result of these mutant analyses it can be assumed that though there are high identities within amino acid sequences in the protein families of the CBLs and the CIPKs there is only limited functional redundancy. Signal transduction occurs specific by passing the signal from one CBL to its specific interacting CIPK. AtCBL1 seems to be a general calcium sensor involved in different pathways.

The type B response regulator ARR2 is also involved in stress responses. Loss of ARR2 by an insertion of a Ds-transposon leads to pleiotropic effects in the anatomy in growth and variations in the structure of the flowers as well as in physiological changes. Leaves formed in juvenile plants develop necrotic spots. This mutant demonstrates a higher resistance to drought and salt in contrast to its corresponding

wildtype. Analyzing the *arr2* mutant led to the identification of a new ethylene signal transduction pathway. In cooperation with the group of Klaus Harter in Freiburg insensitivity of the mutant to the plant hormones ethylene and cytokinin has been observed. This observation pointed to the pathways in which the ARR2 protein may be involved. In three-hybrid analysis an interaction via the histidin transfer protein AHP2 with the ethylene receptor ETR1 was established. Starting from this receptor a phosphorelay starts ending on the ARR2 protein.

Analyzing the different mutants and the interaction studies of the CBL/CIPK network and of the ARR2 protein revealed the importance of these proteins in plant signal transduction. The work provides the evidence for generation and mechanisms leading to specificity and cross-talk in these pathways. A loss of these proteins by insertions leads to multiple interferences in the physiology of the plants. Further mutant analysis of double mutants will allow to investigate the complexity of the single signal transduction pathways in more detail and contribute to identify more details of the network of stress responses within plants in the near future.

## 8 Literatur

- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K. und Kudla, J. (2001) The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinases. *Embo J*, **20**, 1051-1063.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E. und Schroeder, J.I. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, **411**, 1053-1057.
- Allen, G.J., Kwak, J.M., Chu, S.P., Llopis, J., Tsien, R.Y., Harper, J.F. und Schroeder, J.I. (1999) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J*, **19**, 735-747.
- Bartel, P.L. und Fields, S. (1997) *The yeast-two hybrid system*. New York, Oxford University Press.
- Bechtold, N. und Pelletier, G. (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*, **82**, 259-266.
- Bibikova, T.N., Zhigilei, A. und Gilroy, S. (1997) Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta*, **203**, 495-505.
- Blatt, M.R. (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 221-241.
- Bleecker, A.B., Estelle, M.A., Somerville, C. und Kende, H. (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **241**, 1086-1089.
- Bleecker, A.B. und Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 1-18.
- Bohnert, H.J. und Sheveleva, E. (1998) Plant stress adaptations--making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 267-274.
- Borovkov, A.Y. und Rivkin, M.I. (1997) XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques*, **22**, 812-814.
- Borsani, O., Valpuesta, V. und Botella, M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and by osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, **126**, 1024-1030.
- Bowler, C. und Fluhr, R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci*, **5**, 241-246.
- Breuder, T., Hemenway, C.S., Movva, N.R., Cardenas, M.E. und Heitman, J. (1994) Calcineurin is essential in cyclosporin A- and FK506-sensitive yeast strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5372-5376.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A E. coli strain with a beta-galactosidase selection. *Bio. Techniques*, **5**, 376.
- Cardenas, M.E., Hemenway, C., Muir, R.S., Ye, R., Fiorentino, D. und Heitman, J. (1994) Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *Embo J*, **13**, 5944-5957.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. und Meyerowitz, E.M. (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, **262**, 539-544.
- Chang, C. und Shockey, J.A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 352-358.

- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A. und Dangl, J.L. (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, **77**, 565-577.
- Doherty, J.P., Lindeman, R., Trent, R.J., Graham, M.W. und Woodcock, D.M. (1993) *Escherichia coli* host strains SURE and SRB fail to preserve a palindrome cloned in lambda phage: improved alternate host strains. *Gene*, **124**, 29-35.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 316-323.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R. und Long, S.R. (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, **85**, 673-681.
- Faure, J.D., Gingerich, D. und Howell, S.H. (1998) An *Arabidopsis* immunophilin, AtFKBP12, binds to AtFIP37 (FKBP interacting protein) in an interaction that is disrupted by FK506. *Plant J*, **15**, 783-789.
- Ferrando, A., Farras, R., Jasik, J., Schell, J. und Koncz, C. (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J*, **22**, 553-560.
- Fluhr, R. (1998) Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends in Plants Science*, **3**, 141-146.
- Gamble, R.L., Coonfield, M.L. und Schaller, G.E. (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7825-7829.
- Grossel, M.J., Wang, H., Gadea, B., Yeung, W. und Hinds, P.W. (1999) A yeast two-hybrid system for discerning differential interactions using multiple baits. *Nat Biotechnol*, **17**, 1232-1233.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. und Zhu, J.K. (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, **13**, 1383-1400.
- Guzman, P. und Ecker, J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, **2**, 513-523.
- Halfter, U., Ishitani, M. und Zhu, J.K. (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3735-3740.
- Hardie, D.G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classifications and functions. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 97-131.
- Harmon, A.C., Gribskov, M. und Harper, J.F. (2000) CDPKs - a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? *Trends Plant Sci*, **5**, 154-159.
- Harper, J.F. (2001) Dissecting calcium oscillators in plant cells. *Trends in Plant Science*, **6**, 395-397.
- Hemenway, C.S. und Heitman, J. (1999) Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys*, **30**, 115-151.
- Hetherington, A.M. (1998) Plant physiology: spreading a drought warning. *Curr Biol*, **8**, R911-913.
- Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R.O., Przybyla, D., Miersch, O., Buchala, A. und Apel, K. (2001) Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J*, **26**, 435-446.
- Holmberg, N.B., L. (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, **3**, 61-66.
- Hwang, I., Chen, H.-C. und Sheen, J. (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **129**, 5000-5515.

- Hwang, I. und Sheen, J. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, **413**, 383-389.
- Hwang, I., Sze, H. und Harper, J.F. (2000) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6224-6229.
- Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T. und Sano, H. (1999) Sucrose and Cytokinin Modulation of WPK4, a Gene Encoding a SNF1-Related Protein Kinase from Wheat. *Plant Physiol*, **121**, 813-820.
- Ingram, J. und Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 377-403.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. und Kakimoto, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, **409**, 1060-1063.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W. und Zhu, J.K. (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, **12**, 1667-1678.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O. und Thomashow, M.F. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280**, 104-106.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. und Ecker, J.R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, **72**, 427-441.
- Kim, J., Harter, K. und Theologis, A. (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11786-11791.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Gupta, R. und Luan, S. (2000) Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol*, **124**, 1844-1853.
- Klee, C.B., Ren, H. und Wang, X. (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem*, **273**, 13367-13370.
- Knight, H. und Knight, M.R. (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci*, **6**, 262-267.
- Knight, H., Trewavas, A.J. und Knight, M.R. (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J*, **12**, 1067-1078.
- Koch, E. und Slusarenko, A. (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell*, **2**, 437-445.
- Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of Ti-plasmid gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 383-396.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grisse, W. und Luan, S. (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4718-4723.
- Larkindale, J. und Knight, M.R. (2002) Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Abscisic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiol*, **128**, 682-695.
- Leon, J., Rojo, E., Titarenko, E. und Sanchez-Serrano, J.J. (1998) Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, **258**, 412-419.

- Liu, J. und Zhu, J.K. (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14960-14964.
- Liu, J. und Zhu, J.K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, **280**, 1943-1945.
- Löbler, M. und Lee, J. (1998) Jasmonate signalling in barley. *Trends in Plant Science*, **3**, 8-9.
- Lohrmann, J., Albrecht, V., Hummel, F., Haß, C., Sweere, U., Schäfer, E., Kudla, J. und Harter, K. (in revision) The response regulator ARR2 mediates ethylene hormone signalling in *Arabidopsis*.
- Lohrmann, J. und Harter, K. (2002) Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol*, **128**, 363-369.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schafer, E., Kudla, J. und Harter, K. (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 2-13.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. und Grissem, W. (2002) Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins: Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S389-S400.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. und Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245.
- Malhó, R. (1999) Coding information in plant cells: the multiple roles of Ca<sup>2+</sup> as a second messenger. *Plant Biology*, **1**, 487-494.
- Martin, M.L. und Busconi, L. (2000) Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J*, **24**, 429-435.
- McAinsh, M.R. und Hetherington, A.M. (1998) Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling systems. *Trends in Plant Science*, **3**, 32-36.
- McCormac, A.C., Elliott, M.C. und Chen, D.F. (1998) A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Mol Biotechnol*, **9**, 155-159.
- Messerli, M.A., Creton, R., Jaffe, L.F. und Robinson, K.R. (2000) Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth. *Dev Biol*, **222**, 84-98.
- Navazio, L., Bewell, M.A., Siddiqua, A., Dickinson, G.D., Galione, A. und Sanders, D. (2000) Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8693-8698.
- Nozawa, A., Koizumi, N. und Sano, H. (2001) An *Arabidopsis* SNF1-related protein kinase, AtSR1, interacts with a calcium-binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light. *Plant Cell Physiol*, **42**, 976-981.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D. und Hanson, A.D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 128-134.
- Ohba, H., Steward, N., Kawasaki, S., Berberich, T., Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T. und Sano, H. (2000) Diverse response of rice and maize genes encoding homologs of WPK4, an SNF1-related protein kinase from wheat, to light, nutrients, low temperature and cytokinins. *Mol Gen Genet*, **263**, 359-366.

- Onate-Sanchez, L. und Singh, K.B. (2002) Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol*, **128**, 1313-1322.
- Parinov, S., Sevugan, M., De, Y., Yang, W.C., Kumaran, M. und Sundaresan, V. (1999) Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 2263-2270.
- Piao, H.L., Lim, J.H., Kim, S.J., Cheong, G.W. und Hwang, I. (2001) Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, **27**, 305-314.
- Pieterse, C.M. und van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci*, **4**, 52-58.
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H. und Knight, M.R. (1999) Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J*, **18**, 491-497.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B. und Reinbothe, C. (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, **6**, 1197-1209.
- Ritz, O. (2000) Funktionelle Analyse der CBL-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Ulm.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R. und Jones, J.D. (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo J*, **20**, 5556-5567.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. und Izui, K. (2000) Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, **23**, 319-327.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. und Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S401-417.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schaller, G.E., Mathews, D.E., Gribskov, M. und Walker, J.C. (in revision) Two-component signalling elements and histidyl-aspartyl-phosphorelays.
- Schopfer, P. und Brennicke, A. (1999) *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. und Zhu, J.K. (2002) The Putative Plasma Membrane Na(+)/H(+) Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na(+) Transport in Plants. *Plant Cell*, **14**, 465-477.
- Shi, J., Kim, K.N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S. und Kudla, J. (1999) Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 2393-2405.
- Snedden, W.A. und Fromm, H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*, **3**, 229-304.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. und Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **69**, 183-215.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. und Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev*, **53**, 450-490.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E. und Harter, K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, **294**, 1108-1111.

- 
- Townley, H.E. und Knight, M.R. (2002) Calmodulin as a Potential Negative Regulator of Arabidopsis COR Gene Expression. *Plant Physiol*, **128**, 1169-1172.
- Trewavas, A. (1999) How plants learn. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4216-4218.
- Überlacker, B. und Werr, W. (1996) Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Mol. Breeding*, **2**, 293-295.
- Weinl, S. (2001) Funktionelle Analyse und Charakterisierung der CIPK-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Ulm.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R. und Chua, N.H. (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science*, **278**, 2126-2130.
- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D. und Zhu, J.K. (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, **1**, 771-781.
- Yalovsky, S., Rodriguez-Concepcion, M. und Gruissem, W. (1999) Lipid modifications of proteins - slipping in and out of membranes. *Trends Plant Sci*, **4**, 439-445.
- Zhu, J.K. (2002) Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **53**, 247-273.
- Zhu, J.K., Liu, J. und Xiong, L. (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, **10**, 1181-1191.

## 9 Anhang

### 9.1 Liste der Primer

Gen	Primerbez.	Sequenzen	Richtung	Schnittstelle	Bemerkungen	
CBL1	CBL1-S1	GAG CTA TTC AAG AGC ATA AGC AGT TCG G	5'-3'		f.Screening	
	CBL1-A1	CAT TGG GGT GGA AAA CAT TGA GTG ATG	3'-5'		f.Screening	
	CBL1-S1N	GGT ACA AAG TTT GTT TCT TTT GAC CC	5'-3'		f.Screening	
	CBL1-A1N	CCC CGA AAT CGA TGA CTC CTT TTC GTT	3'-5'		f.Screening	
	CBL1D1	TTG GAT CCC CAA GAG GTC AAG CAA ATG TTG	5'-3'	Bam H1	Deletion	
	CBL1D1R	TTT GAA TTC TCA TGT CGC AAT CTC ATC GA	3'-5'	Eco R1	Deletion	
	CBL1F02/ F02-1	TTG CCT CTG AGA CAG CTT TTA GTG T	5'-3'		RT-PCR	
	CBL1R02/ R02-1	GTT GTC GTA ATA TCC CTG AGA TAT G	3'-5'		RT-PCR	
	CBL1promF	TTT TTC TAG ATC TAA AAA TTC AAA ATT GGT AAC TCA C	5'-3'	XbaI	Promotor-Gus-Fusion	
	CBL1promR	TTT TCC CGG GTT ACA GAT GAA ATA AGA CGA TGA AAC C	3'-5'	XmaI	Promotor-Gus-Fusion	
	CBL1promR2	TTT GGT ACC CCC GGG TTA CAG ATG AAA TAA GAC GAT GAA ACC	3'-5'	Eco R1	Promotor-Gus-Fusion	
	CBL1cDNAF	TTT GAA TTC TCT TTT TGC TGT TTC TAG CTC CT	5'-3'	EcoRI	Promotor-Gus-Fusion	
	CBL1innenR	TTT GAA TTC GAG AAA GAG AGA GGA GAC GAA GAA	3'-5'	EcoRI	Promotor-Gus-Fusion	
	CBL1promF1 CY5	GTT GAA GGA GAT ACG CCT GTG	5'-3'		Sequenzieren	
	CBL1promR1 CY5	CAA CTT GAT TGT TAC GTA AGC ATA CA	3'-5'		Sequenzieren	
	CBL2	CBL23-S1	ACG AYA ATG GAA TAC TGG GGT TTG AGG			f.Screening
		CBL23-A2	AGG WTT CTC CAC TCT TCC TTA TCG ATC			f.Screening
CBL23S1N		TGC TCT CTC YGT CTT TCA YCC AAA TGC			f.Screening	
CBL2-A1N		CGT CTT CCT CAA ACG TCT GAA ACA TTC			f.Screening	
CBI2FLAG		GAA TTC CTA CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC GGT ATC TTC AAC CTG AGA AT	3'-5'	Eco R1		
CBL3	CBL3-A1N	TGT ATC AGC TTC CTC AAA TGT CTG TG			f.Screening	
CBL5	CBL5-S1	ACG ATG GGG CTA TAG ATT TTG GAG AG	5'-3'		f.Screening	
	CBL5-A1	GCA TAA GTT CTG ATT CCT CTA GAA CGT C	3'-5'		f.Screening	
	CBL5-S1N	CCC AAA CTC ATC ACC AAG AGA TAA GGC C	5'-3'		f.Screening	
	CBL5-A1N	CAC CTA TAG TTT CTC CAA GTC GAG G			f.Screening	
CBL6	CBL6-S1	TTG AAG CCT TTG CTC GTT CAC TTT CGG	5'-3'		f.Screening	
	CBL6-A1	CCA CTC TTC CTT ATC AAT CTT CCC GTC C	3'-5'		f.Screening	
	CBL6-S1N	GGA TAA GAT TGA GTG TAA GTG GTC GAG			f.Screening	
	CBL6-A1N	CAG CTT CTT CAA ATG TCT ACA CAC ACC			f.Screening	
	CBL6FLAG	GAA TTC CTA CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC TCC ATC CAG CTC ACT AGG		Eco R1		
CBL7	CBL7F	TTT GGA TCC CAT GGA TTC AAC AAG AAA TTC AGC	5'-3'	Bam H1		
	CBL7R	TTT GAA TTC TCA GGT ATC TTC CAC TTG CGA	3'-5'	Eco R1		
CBL8	CBL8F	TTT GGA TCC CAT GTT GGC ATT CGT GAA ATG	5'-3'	Bam H1		
	CBL8R	TTT GAA TTC CTA GTC TTC AAC TTC AGA GTC GAG TAC	3'-5'	Eco R1		
CBL9	CBL9F	TTT GGA TCC CAT GGG TTG TTT CCA TTC CAC	5'-3'	Bam H1		
	CBL9R	TTT GAA TTC TCA CGT CGC AAT CTC GTC	3'-5'	Eco R1		
CIPK1	CBIK-S1	GGT AAT GGA ACT TGT TAC CGG AGG AGA	5'-3'		f.Screening	
	CBIK-A1	AGG CAG AGC ACT GAG GCC AAA ATC AGT	3'-5'		f.Screening	
	CBIK-S1N	CGA CAG AAT TGT AAG ACT CTT ACT AGC C	5'-3'		f.Screening	

	CBIK-A1N	CCC TTT GCA TCA AGA ACA TTC TC	3'-5'		f.Screening
	KinD9	TTT GAA TTC CTA CTC AAG TTT GAA CCA CTC GCT	3'-5'	Eco R1	Deletion
	kinD8	TTT GGA TCC CGA TTC ACC GAC CAT CAT CAA T	5'-3'	Bam H1	Deletion
	kinD81	TTG GAT CCC GAT TCA GCG ACC ATC ATC AAT	5'-3'	Bam H1	Mutationsdeletion
	KIND82	TTG GAT CCC GAT TCA CCG ACC ATC ATC AAT CCG TTT C	5'-3'	Bam H1	Mutationsdeletion
	KIND83	TTG GAT CCC GAT TCA CCG ACC ATC ATC AAT GCG TTT CAG TTA AAC GGA AT	5'-3'	Bam H1	Mutationsdeletion
	KIND84	TTG AAT TCC TAA AAG AAA CCG GAC AGG TCA AGA AAG GAA TTC ATT CCG	3'-5'	Eco R1	Mutationsdeletion
	KIND85	TTT GAA TTC CTA AAA GAA ACC GGA GTT GTC AAG AAA G	3'-5'	Eco R1	Mutationsdeletion
	KIND86	TTT GAA TTC CTA AGG GAA ACC GGA CAG GTC	3'-5'	Eco R1	Mutationsdeletion
	CBIK1-1F	TTT GGA TCC CCT TGA GTA CAT TCC TTC AAT TCC C	5'-3'	Bam H1	PROTEINSYNTHESE/ Antikörper
	CBIK1-1R	TTT CTT AAG CCA GTT ACT ATC TCT TGC TCC GGC GA CCT CTC TGA TAC ATT CTC TTG TTC ACT GCC CTT CCC TTC TTC	3'-5'	Eco R1	PROTEINSYNTHESE/ Antikörper
	NAFdel1	GAA GAA GGG AAG GGC AGT GAA CAA GAG AAT GTA TCA GAG AGG	3'-5'		Deletion
	NAFdel2	GAA GAA GGG AAG GGC AGT GAA CAA GAG AAT GTA TCA GAG AGG	5'-3'		Deletion
	CIPK1CY5	TCC AGT CAC GAG GAT CAC AGT	5'-3'		Sequenzieren
	CIPK1CY5-02	CAT CCC CAC ATT GTT AGA TTA CAT GA	5'-3'		Sequenzieren
	CIPK1F02-RT	GTT CGA CAG AAT TGT TTC CAA CG	5'-3'		RT-PCR
	CIPK1R02-RT	CTT CTT CTG ATC CGA GTT CTT GG	3'-5'		RT-PCR
	CIPK1promF	TTT TCC CGG GCC AAT CAA TCT CCT ATT TCA ATT TAT TT	5'-3'	Xmal	Promotor-Gus-Fusionen
	CIPK1promF2	TTT TCC GCC AAT CAA TCT CCT ATT TCA ATT TAT TT	5'-3'	Xmal	Promotor-Gus-Fusionen
	CIPK1promR	TTT TTC TAG AAC TCT ACA TAG GAA GCT AGA GTT GTA AC	3'-5'	Xbal	Promotor-Gus-Fusionen
	CIPK1prom CY5F	AAG AGA GGA CGC TAC TTC TCT TTG			Sequenzieren
	CIPK1promF2 CY5	TAT GAT GTA TAT TGC GAA TAT GTG TGT			Sequenzieren
	CIPK1prom CY5R	GCA ATA CTA TCA CCG GCC AT			Sequenzieren
CIPK2	CBIK4F	TTT GGA TCC CAT GGA GAA CAA ACC AAG TGT A	5'-3'	BamHI	
	CBIK4R	TTT GAA TTC CTA TGA TGG TTC TTG CTC TCC T	3'-5'	EcoRI	
	CIPK2CY5	CAC CGC GAC ATT AAG CC	5'-3'		Sequenzieren
CIPK3	CBIK9F	TTG GAT CCC ATG AAT CGG AGA CAG CAA GTG	5'-3'	Bam H1	
	CBIK9R	TTT TCA GCT GTC ACT TTG CTG TTT CTT TCT TAA CTT	3'-5'	Sal 1	
	CIPK3R02	TTT TCA GCT ACT TTG CTG TTT CTT TCT TAA CTT	3'-5'	Sal 1	
CIPK4	CBIK5F	TTG GAT CCC ATG GAA TCT CCA TAT CCA AAA TCA C	5'-3'	Bam H1	
	CBIK5R	TTT GAA TTC TCA ATT GTG CCA TGA GAG CA	3'-5'	Eco R1	
	CIPK4CY5	CGA GAA TAA TCC GAG AGA TCG A	5'-3'		Sequenzieren
CIPK5	CBIK10F	TTG AAT TCC ATG GCC GAA GAC TCT AAT TCT	5'-3'	Eco R1	
	CBIK10R	TTT TTG TCG ACT TAC GGT TTG TCA GGA ACT TTA T	3'-5'	Sal1	
	CIPK5CY5	TCA TGG AGC TAG CA AAG GT	5'-3'		Sequenzieren
CIPK6	CBIK6F	TTG GAT CCC ATG GTC GGA GCA AAA CCG	5'-3'	Bam H1	
	CBIK6R	TTT GAA TTC TCA AGC AGG TGT AGA GGT CCA	3'-5'	Eco R1	
	CIPK6CY5	CAC VGA GAT CTG AAA CCG GAG AAT C	5'-3'		Sequenzieren
CIPK7	CBIK2F	TTG GAT CCC ATG GAA TCA CTT CCC CAG CC	5'-3'	Bam H1	
	CBIK2R	TTT GAA TTC TTA CAT GAT GTC ATT GTG CAA T	3'-5'	Eco R1	
	CBIK2CY5	GGA GCA TCT ACA AAA CGG ATT	5'-3'		Sequenzieren
CIPK8	CBIK3F	TTT GAA TTC ATG GTG GTA AGG AAG GTG G	5'-3'	EcoRI	
	CBIK3R	TTT TGT CGA CTC AAC GTC TTT TAC TCT TGG CCT	3'-5'	Sall	
	CBIK3CY5	GAG TTA CCA TCC TAA AGA	5'-3'		Sequenzieren

CIPK9	CBIK7F	TTG GAT CCC ATG AGT GGA AGC AGA AGG AAG GC	5'-3'	Bam H1	
	CBIK7R	TTT GAA TTC TTA TTG CTT TTG TTC TTC AGC GG	3'-5'	Eco R1	
	CIPK9CY5	GAA GAT CZA TAT CGT TCTBTGA GCT T	5'-3'		Sequenzieren
CIPK10	CBIK8F	TTG GAT CCC ATG GAA AAT AAG CCA AGT GTT TTG ACT	5'-3'	Bam H1	
	CBIK8R	TTT GAA TTC TCA AAA CTT CAA TGG TTC TTC CT	3'-5'	Eco R1	
	CIPK10CY5	CAA GGG AAA TTG AGA GAT GAT GT	5'-3'		Sequenzieren
CIPK11	CBIK11F	TTG GAT CCC ATG CCA GAG ATC GAG ATT GCC	5'-3'	Bam H1	
	CBIK11R	TTT GAA TTC TAA ATA GCC GCG TTT GTT GA	3'-5'	Eco R1	
	CIPK11CY5	CCG GAG ATA TTT CCA GCA A	5'-3'		Sequenzieren
CIPK12	CBIK14F	TTG GAT CCC ATG GCG GAG AAA ATC ACG	5'-3'	Bam H1	
	CBIK14R	TTT TGT CGA CCT ATT CAG TGT CAG ACG GCA A	3'-5'	Sal1	
	CIPK12CY5	GGA GTA TGT TCG TGG AGG TGA	5'-3'		Sequenzieren
CIPK13	CBIK15F	TTG GAT CCC ATG GCT CAA GTA CTA TCT ACA CCG T	5'-3'	Bam H1	
	CBIK15R	TTG AAT TCT CAC TGT TCA ATT TCA GGT GG	3'-5'	Eco R1	
	CIPK13CY5	CGA GGC GGA GAG CTT TAT AAT	5'-3'		Sequenzieren
CIPK14	CBIK20F	TTT GGA TCC CAT GGT AGA TTC TGA CCC GGT	5'-3'	Bam H1	
	CBIK20R	TTT GTC GAC CTA CGA CGT CGT ATG TAC TTG AGT T	3'-5'	Sal1	
	CIPK14CY5	CGC TAT CAT GCA CCG TCT G			
CIPK15	CBIK12F	TTG AAT TCC ATG GAG AAG AAA GGA TCT GTG TT	5'-3'	Eco R1	
	CBIK12R	TTT TGT CGA CTC AGT GCC AAG CTA ATA CAA AGT C	3'-5'	Sal1	
	CIPK15CY5	GGT GAG CTC TTC AAC AAA GTG T	5'-3'		Sequenzieren
CIPK16	CBIK13F	TTG AAT TCC ATG GAA GAA TCA AAC CGT AGT AGT AC	5'-3'	Eco R1	
	CBIK13R	TTT TGT CGA CTC ATG AAA CAT TAT TTA TTT TGT TAT CAT T	3'-5'	Sal1	
SNF	SNFD1F	TTT GGA TCC CCC AGT AGT TCT CAA TGC ATT TGA	5'-3'	Bam H1	Deletion
	SNFD1R	TTT GAA TTC CTA TGA GTC AAA TGA GTT CCC AAG ATT	3'-5'	Eco R1	Deletion
ARR2	ARR2S1	ATG GTA AAT CCG GGT CAC G	5'-3'		Screening
	ARR2A1	TGC GCT CTC TGC TCT TGT T	3'-5'		Screening
	ARR2A1N	GAA CAG AGA ACT AAG CGA T	3'-5'		Screening
	ARR2RTF	CCT GTT ATC ATG ATG TCT GCG G	5'-3'		RT-PCR
	ARR2RTR	GAA CAG CTT CGT CAA CGC CT	3'-5'		RT-PCR
	ARR2promF CY5	GTT GTA TAT ACG TTG GTG TAG AGA TGT	5'-3'		Sequenzieren
	ARR2promF2 CY5	GTA TCC TTT TAT GGT TTT GGT CTA TTG T	5'-3'		Sequenzieren
	ARR2promR CY5	GTT AAA AAT TCT TAC AGA AAA CCC CA	3'-5'		Sequenzieren
TUBULIN	tubulinF	ATG CGA GAG ATT CTT CAC ATA CAA G	5'-3'		Sonde
	tubulinR	GGA GTG GTG AGC TTA AGA GTT CT	3'-5'		Sonde
Vektoren	pACTF	CTAB CAG GGA TGT TTA ATA CCA CTA CAA			
	pACTF2	GCC TCC TCT AAC GTT CAT GAT			
	pACTR	TTG AGA TGG TGC ACG ATG CAC AGT			
	BDF	TCA TCG GAA GAG AGT AG			
	BDR	TAA TCA TAA GAA ATT CGC CCG			
	THBDRCY5	TAA TCA TAA GAA ATT CGC CCG			Sequenzieren
	pJRF	CGG TAG GTA TTG ATT GTA ATT CTG			
	pJRR	CGT AAA GGA TGG GGA AAG A			

	CY535S	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC CTT C			Sequenzieren
	CY5GFPR	CCA CTG ACA GAA AAT TTG TGC CC			Sequenzieren
	uidA-R	GAT CTT CAC TCG CGA CCG			GUS-Gen
	Pnos-R	GCT TGT CCC GCG TCA T			Nos-Promotor
	PQE31F	CAA TTA TAA TAG ATT CAA TTG TGA GCG GA			
	JKT7P	TAA TAC GAC TCA CTA TA			
	JKT7T	GCT AGT TAT TGC TCA GC			
T-DNA	RB2	TCC TTC AAT CGT TGC GGT TCT GTC AGT TC			Feldmann-Linien
	LB2	GAT GCA CTC GAA ATC AGC CAA TTT TAG AC			Feldmann-Linien
	DW-LB2	CCA TTT GGA CGT GAA TGT AGA CAC GTC GA			Detlef-Weigel-Linien
	VS-RB1	CGC TGA TAC CAG ACG TTG CCC GCA TAA			Versailles-Linien
	VS-LB1	CTA CAA ATT GCC TTT TCT TAT CGA CCA TG			Versailles-Linien
	TJ-RB1	GAA TGG CGA ATG AGA CCT CAA TTG CGA GC			Tom-Jack-Linien
	TJ-LB1	GAA CAT CGG TCT CAA TGC AAA AGG GGA AC			Tom-Jack-Linien
	DS3-2	CGA TTA CCG TAT TTA TCC CGT TC			Sundaesan-Linien
	DS5-2	TCC GTT CCG TTT TCG TTT TTT AC			Sundaesan-Linien
	DS3-3	TCG TTT CCG TCC CGC AAG T			Sundaesan-Linien

## 9.2 Lebenslauf

Mutter: Dorothea Charlotte Albrecht

Vater: Hans-Dietrich Albrecht

05. Febr. 1973	geboren in Montevideo/ Uruguay S.A.
Juni 1976	Umsiedlung nach Deutschland
Sept. 1979 - Juli 1983	Mörike-Grundschule/ Lorch (Baden-Württemberg)
Sept. 1983 - Okt. 1984	Progymnasium Lorch (Baden-Württemberg)
Okt. 1984 - Juni 1992	Hellenstein-Gymnasium in Heidenheim an der Brenz Schulabschluß: Abitur
Aug. 1992- Juli 1993	Freiwilliges Soziales Jahr in Paraguay S.A.
Okt. 1993 - April 1999	Biologiestudium an der Universität Ulm
Aug. 1996 - Juni 1997	Auslandsstudium an der Universidad de Costa Rica
April 1999	Abschluß: Diplom (gut) Diplomarbeit in der Systematischen Botanik und Ökologie bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Gottsberger. Thema der Diplomarbeit: "Ornithophile und entomophile Acanthaceae und Gesneriaceae und ein Vergleich ihrer blütenmorpho- metrischen und reproduktionsbiologischen Merkmale"
seit Mai 1999	Doktorandin in der Abteilung Molekulare Botanik

### 9.3 Abkürzungen

3'	Das Ende von Nukleinsäuren mit OH-Gruppe; abgeleitet vom 3' C-Atom der Ribose
5'	Das phosphattragende Ende von Nukleinsäuren; abgeleitet vom 5' C-Atom der Ribose
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARR2	Response Regularor 2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus (Blumenkohl Mosaik Virus)
CBL	Calcineurin B-like
CIPK	CBL-interagierende Protein-Kinase
C-terminal	Carboxyterminales Ende eines Proteins
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds	Dissociation-Transposon
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	„green fluorescent protein“, ein grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea</i>
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
kb	Kilobasen
min.	Minuten
mRNA	Boten- (messenger-) Ribonukleinsäure
NCBI	National Center of Biotechnology Information
N-terminal	Aminoternales Ende eines Proteins
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	gekoppelte Methode zur Amplifikation von DNA Fragmenten ausgehend von RNA Molekülen
SD-LT	Hefe-Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan
SD-LTH	Hefe-Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin

---

SDS	Sodiumdodecylsulfat
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>x</sub>	Bezeichnung für die x-te Generation einer transgenen Pflanzenlinie
U	Unit, Enzymeinheit
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	ml pro 100 ml (volume/volume)
w/v	Gramm pro 100 ml (weight/volume)
WT	Wildtyp
x g	mal Erdbeschleunigung

## 9.4 Veröffentlichungen

### Schriftliche Publikationen

Jinrui Shi, Kyung-Nam Kim, Olga Ritz, Verónica Albrecht, Rajeev Gupta, Klaus Harter, Sheng Luan, and Jörg Kudla (1999): Novel Protein Kinases associated with Calcineruin B-like Calcium Sensors in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 2393-2406.

Verónica Albrecht, Olga Ritz, Sabine Linder, Klaus Harter, and Jörg Kudla (2001): The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $Ca^{2+}$  regulated kinases. *The EMBO Journal* 20, 1051-1063.

Jens Lohrmann, Verónica Albrecht, Florian Hummel, Claudia Haß, Uta Sweere, Eberhard Schäfer, Jörg Kudla and Klaus Harter: The Arabidopsis Response Regulator ARR2 functions as an output element of a two-component System involved in ethylene signaling. In Revision.

### Präsentationen (Vortrag (V), Poster (P) persönliche Teilnahme (T))

Verónica Albrecht, und Gerhard Gottsberger (1999) P, T: Vergleich der blütenmorphometrischen und reproduktionsbiologischen Blütenmerkmale ornithophiler und entomophiler Acanthaceae und Gesneriaceae der Neotropen. 12 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Tropenökologie, Ulm.

Verónica Albrecht, Olga Ritz, Sabine Linder, Klaus Harter, and Jörg Kudla (2000) P, T: The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $Ca^{2+}$  regulated kinases. Botanikertagung, Jena.

Verónica Albrecht, Stefan Weinl, Sabine Linder, Klaus Harter und Jörg Kudla (2001) V, T: Die NAF-Domäne definiert ein neues Protein-Protein Interaktionsmodul in  $Ca^{2+}$ -regulierten Kinasen. 14. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, Dabringhausen.

Verónica Albrecht, Stefan Weinl, Klaus Harter and Jörg Kudla (2001) P: Functional interaction of CBL-type sensor proteins and protein kinases in various signalling cascades. 12<sup>th</sup> international Conference on Arabidopsis Research, Madison.

---

Verónica Albrecht, Stefan Weinl, Klaus Harter and Jörg Kudla (2001) P, T: Functional interaction of CBL-type sensor proteins and protein kinases in various signalling cascades. EPS Summerschool on Environmental Signalling: Arabidopsis as a model, Utrecht.

Verónica Albrecht, Stefan Weinl, Klaus Harter and Jörg Kudla (2001) P: Functional interaction of CBL-type calcium sensor proteins and protein kinases in various signaling cascades. Plant Protein Phosphorylation, Wien.

Stefan Weinl, Verónica Albrecht, Oliver Batistic, Dragica Blazevic, Klaus Harter and Jörg Kudla (2002) P: Mechanisms generating specificity within CBL-type calcium sensor protein / CBL-interacting protein kinases signalling network. Keystone Symposium on Specificity and Crosstalk in Plant Signal Transduction, Lake Tahoe.

Jens Lohrmann, Verónica Albrecht, Florian Hummel, Claudia Hess, Eberhard Schaefer, Jörg Kudla and Klaus Harter (2002) P: Involvement of the *Arabidopsis* response Regulator ARR2 in ethylene signalling. Keystone Symposium on Specificity and Crosstalk in Plant Signal Transduction, Lake Tahoe.

Claudia Hass, Florian Hummel, Jens Lohrmann, Verónica Albrecht, Uta Sweere, Jörg Kudla and Klaus Harter (2002) P: Involvement of the *Arabidopsis* response regulator ARR2 in ethylene signalling. 15. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, Dabringhausen.

Verónica Albrecht, Stefan Weinl, Dragica Blazevic, Oliver Batistic, Üner Kolukisaoglu, Burkhard Schulz, Klaus Harter and Jörg Kudla (2002) V: A Calcineurin B-like calcium sensor protein essential for integration of plant responses to abiotic stresses. 13<sup>th</sup> international Conference on Arabidopsis Research, Sevilla.

Stefan Weinl, Üner Kolukisaoglu, Dragica Blazevic, Oliver Batistic, Verónica Albrecht, and Jörg Kudla (2002) P: Comprehensive genomic analysis of the CBL calcium sensor/CBL-interacting protein kinase network. 13<sup>th</sup> international Conference on Arabidopsis Research, Sevilla.

Uta Sweere, Claudia Hass, Florian Hummel, Jens Lohrmann, Verónica Albrecht, Jörg Kudla and Klaus Harter (2002) P: Involvement of the *Arabidopsis* Response Regulator ARR2 in stress and hormone signalling. 13<sup>th</sup> international Conference on Arabidopsis Research, Sevilla.

## Danksagung

Hiermit möchte ich denen danken, die mir nicht nur diese Doktorarbeit ermöglicht haben, sondern mich auch auf die unterschiedlichste Art und Weise darin unterstützt haben.

Dr. Jörg Kudla möchte ich dafür danken, dass er mich während der letzten Jahre so gut betreut hat und mir in vielen anregenden Diskussionen die Materie der molekularen Biologie näher gebracht hat.

Prof. Dr. Axel Brennicke danke ich dafür, dass ich diese Arbeit in der Abteilung durchführen konnte und für die vielen guten Gespräche über Reisen.

Dr. Klaus Harter, Dr. Burkhard Schulz und Dr. Uener Kolukisaoglu danke ich für die äußerst produktive Zusammenarbeit.

Den studentischen Hilfskräften Susanne Bartels, Anke Berger und vor allem Stefan Weini, der in dieser Arbeitsgruppe mit einer Diplomarbeit weitergemacht hatte und inzwischen an seiner Doktorarbeit beschäftigt ist, danke ich sehr für die Hilfe in der Arbeit mit den Pflanzen.

Ganz besonders möchte ich den Leuten aus der Arbeitsgruppe von Jörg Kudla dafür danken, Mike, Oli, Joachim, Andy W., Katrin, Regina und Andy S., dass sie oft mit ihren Späßen für eine gute Stimmung im Labor gesorgt haben. Auch kann man sich immer auf sie verlassen und sie jederzeit nach irgendwelchen Informationen fragen, es war immer Zeit füreinander da.

Sabine Linder und Dragica Blacevic danke ich für die Unterstützung in den doch oft mühsamen Sequenzierungen der isolierten cDNAs aber auch für die vielen kleinen anderen Dinge, die einem das Leben im Labor erleichtern.

Auch den Leuten im privaten Bereich sei ein besonderer Dank ausgesprochen, und da vor allem meine Eltern und beiden Schwestern. Sie haben mir nicht nur durch das Studium geholfen, sondern waren auch jetzt immer da, wenn ich sie gebraucht habe.

Auch den Freunden möchte ich danken, die mir immer wieder gezeigt haben, dass man manchmal auch etwas anderes tun kann als sich nur mit seiner Doktorarbeit zu beschäftigen. In vielen Gesprächen und langen Spaziergängen hat sich mein Freund Michael immer sehr viel Zeit genommen über die Arbeit zu reden und mir damit sehr weitergeholfen. Dankeschön!